



Sofia Isabel Batista da Silva

Licenciatura em Biotecnologia

**Novos compósitos poliméricos
derivados de produtos naturais
marinhos com atividade antimicrobiana
contra MRSA**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Dr^a Susana P. Gaudêncio; REQUIMTE
LAQV, UCIBIO DQ/DCV-FCT/UNL

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Almeida; CENIMAT-
FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof^a Doutora Ana Cecília Afonso Roque

Arguente: Doutora Maria Miragaia

Vogal: Doutora Susana P. Gaudêncio



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2016



Sofia Isabel Batista da Silva

Licenciatura em Biotecnologia

**Novos compósitos poliméricos
derivados de produtos naturais
marinhos com atividade antimicrobiana
contra MRSA**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Dr^a Susana P. Gaudêncio; REQUIMTE LAQV, UCIBIO DQ/DCV-FCT/UNL

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Almeida; CENIMAT-FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof^a Doutora Ana Cecília Afonso Roque

Arguente: Doutora Maria Miragaia

Vogal: Doutora Susana P. Gaudêncio

Setembro 2016

Novos compósitos poliméricos derivados de produtos naturais marinhos com atividade antimicrobiana contra MRSA

Copyright Sofia Isabel Batista da Silva, FCT-UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Dra. Susana Gaudêncio, Dra. Rita Sobral e Dr. Pedro Almeida pelo desafio proposto, pela orientação, pela disponibilidade e ajuda prestada durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. João Canejo, à Dra Ilda Santos-Sanches e ao Dr.Jorge Caldeira pela ajuda na realização das diversas metodologias apresentadas nesta dissertação e pela partilha de conhecimentos.

À Dra. Florbela Pereira agradeço a elucidação de compostos utilizados nesta dissertação.

Ao Prof. Mário Diniz pelo fornecimento da água do mar.

À Helena pelo companheirismo, pela amizade e pela enorme ajuda que foi ao longo deste ano.

Às minhas colegas de laboratório, Bárbara Gonçalves e Raquel Portela, pela paciência e disponibilidade em ajudar-me e pelo bom ambiente no laboratório.

Aos meus colegas de projeto, Lúcia, Ana e Fredilson pela ajuda e partilha de conhecimentos, em particular à Marisa pela elucidação de compostos utilizados neste trabalho.

À Nicole, obrigado por estar sempre disponível para ajudar em tudo o que foi preciso e pela sua boa disposição que torna os dias mais animados.

Às minhas amigas, Ana Nogueira, Ana Gameiro e Sara Gomes pela amizade e pelo apoio durante estes dois anos.

Aos meus pais pelo apoio, pela paciência e por me terem proporcionado a concretização de mais uma etapa da minha formação.

Aos meus amigos de infância, Maria, Marcos, João, Alexandre, Diogo, André e Lúcia, que me apoiam há 24 anos e que apesar da distância estão sempre presentes.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e FEDER pelo financiamento dos projetos PTDC/QUI-QUI/119116/2010, PTDC/FIS-NAN/0117/2014, IF/00700/2014, UID/QUI/50006/2013 e UID/Multi/04378/2013 e ao Sétimo Programa Quadro da União Europeia (FP7/2007-2013) sob o acordo nº PCOFUND-GA-2009-246542 e nº 269138-NanoGuard.

Resumo

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogénica oportunista responsável por diversas doenças e associada a um elevado nível de morbilidade e de mortalidade. A sua capacidade para adquirir resistência aos antibióticos, o seu elevado número de fatores de virulência e a sua competência para formar biofilmes faz deste micro-organismo um enorme problema de saúde pública.

Face à escassez de agentes antimicrobianos, a descoberta de novos produtos naturais bioativos é fundamental para o combate desta problemática. As actinobactérias marinhas têm-se revelado uma fonte promissora de compostos com atividade anti-biofilme e antimicrobiana.

Este trabalho teve dois objetivos relacionados mas distintos. Numa primeira abordagem, identificar novos compostos com atividade anti-biofilme contra estirpes de *S. aureus* (NCTC 8325, WIS, MW2 e HDE288). Para tal, foram testados 7 extratos brutos e 49 compostos puros provenientes de actinobactérias marinhas, dos quais 11 compostos puros revelaram atividades promissoras.

A segunda abordagem foi desenvolver um compósito polimérico para a aplicação em feridas infetadas por MRSA ou como tratamento profilático para queimaduras através da incorporação de compostos com atividade antimicrobiana. Para tal, utilizaram-se dois polímeros, a hidroxipropilcelulose (solúvel em água) e o acetato de celulose (insolúvel em água), nos quais se incorporou o composto comercial tetraciclina. As soluções poliméricas foram depositadas segundo duas técnicas diferentes: técnica da deposição de filmes por espalhamento e electrofiação.

Com base nos resultados obtidos por ensaios de halos de inibição verificou-se uma menor inibição para o filme de AC com tetraciclina em comparação com os discos de tetraciclina comerciais. Em contraste, o filme de HPC resultou numa inibição superior do crescimento bacteriano, este facto aliado à sua solubilidade em água permite que este possa ser utilizado no desenvolvimento de um compósito polimérico indolor. Assim sendo, incorporou-se o composto PTM-420;F2+F3;F35 na solução polimérica de HPC com o intuito de determinar a sua atividade antimicrobiana quando associado ao polímero. Devido a diferenças de solubilidade do compósito polimérico/composto, não foram obtidos resultados de inibição da mesma ordem de grandeza dos obtidos para o filme de HPC com tetraciclina. Para otimizar o sistema incorporou-se o composto PTM-29;F4;F39, menos apolar e com maior afinidade para o polímero. No entanto, o nível de inibição obtido foi semelhante ao composto PTM-420;F2+F3;F35, podendo o fenómeno estar associado com a difusão do composto e a dissolução do polímero. A velocidade de solubilização pode ser benéfica para aplicação do sistema compósito polimérico/composto no tratamento de feridas onde se pretende que o composto seja libertado ao longo do tempo. Futuramente, serão estudados estes parâmetros.

Palavras-chave

Staphylococcus aureus, Resistência aos antibióticos β -lactâmicos, Biofilmes, Actinobactérias marinhas, Produtos naturais marinhos, Compósito polimérico.

Abstract

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogenic bacterium responsible for a wide range of diseases which are associated with a high morbidity and mortality. Their ability to acquire antibiotic resistance, its high number of virulence factors and their ability to form biofilms makes this micro-organism a growing public health threat.

Due the absence of antimicrobial agents, the discovery of new bioactive compounds is fundamental to control this problem. Marine actinobacteria are a source of compounds with high antibiofilm and antimicrobial activity.

This work had two related goals but distinct. Firstly, identified new compounds with antibiofilm activity against *S. aureus* strains ((NCTC 8325, WIS, MW2 e HDE288). So, were tested 7 crude extracts and 49 natural compounds from marine actinobacteria, and 11 natural compounds exhibited powerful activities.

The second perspective was development a polymeric composite for application in infected wounds by MRSA or profilatic treatment for burns through the incorporation of compounds with antimicrobial activity. Two polymers were used, hydroxypropyl cellulose (water soluble) and cellulose acetate (water insoluble), where was incorporated tetracycline compound. The polymeric solutions were deposited for two diferent techniques: films deposition by spreading and electrospinning.

Based on the results obtained by testing inhibition halos, a lower inhibition was obtained for AC film with tetracycline compared with commercial tetracycline disks. In contrast, the HPC film showed higher inhibiton of bacterial growth due to solubility of polymer in water. This fact promotes its utilization in the development of painless polymeric composite.

The compound PTM-420;F2+F3;F35 was incorporated in the polymeric solution of HPC for evaluate the antimicrobial activity. Due to solubility differences of the polymeric composite/compound, weren't obtained inhibition results in same order that HPC film with tetracycline. To optimize the results, the compound PTM-29;F4;F39, less nonpolar and with more affinity to polymer was incororated. However, the inhibition level obtained was silimar for the compound PTM-420;F2+F3;F35. This results can be associated with the diffusion of compound and the polymer dissolution. The solubilization speed can be beneficial to application of polymeric composite/compound system for the treatment of wounds, where the compound should be released overtime. In the future, will be study these settings.

Keywords

Staphylococcus aureus, Resistance to β -lactams antibiotics, Biofilms, Marine actinobacterias, Marine Natural Products, Composite polymeric.

Abreviaturas

AC: Acetato de celulose

AFM: Microscopia de força atômica

CA-MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirido na comunidade

DMSO: Dimetil sulfóxido

DO: Densidade ótica

EPS: Substância exopoliméricas

HA-MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirido em ambiente hospitalar

HPC: Hidroxipropilcelulose

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (high-performance liquid chromatography)

MIC: concentração mínima inibitória

MSSA: *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina

PTM #: Código de identificação da estirpe com o número #

VRE: *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Palavras-chave	v
Abstract	vii
Keywords.....	vii
Abreviaturas	ix
Índice	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvii
1. Introdução	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1 Descrição e importância clínica.....	1
1.1.2 Os mecanismos de resistência aos antibióticos em <i>S. aureus</i>	1
1.1.3 Fatores de virulência em <i>S. aureus</i>	2
1.1.4 Formação de biofilmes por <i>S. aureus</i> – um importante fator de virulência.....	3
1.1.4.1 Função fisiológica e fases de formação do biofilme	3
1.1.4.2 Composição e estrutura dos biofilmes de <i>S. aureus</i>	5
1.1.4.3 Estratégias anti-biofilme existentes.....	5
1.1.5 Estirpes modelo para o estudo de <i>S. aureus</i>	7
1.2 Actinobactérias e a importância dos seus compostos bioativos	9
1.2.1 Compostos antimicrobianos produzidos por actinobactérias.....	10
1.2.2 Metabolitos secundários produzidos por actinobactérias com atividade anti-biofilme	12
1.3 Biopolímeros.....	14
1.3.1 Polímeros solúveis em água – Hidroxipropilcelulose	14
1.3.2 Polímeros insolúveis em água - Acetato de celulose.....	14
1.4 Electrofiação.....	15
1.5 Caracterização mecânica de polímeros	16
1.6 Materiais compósitos bioativos existentes atualmente	18
1.7 Contextualização do trabalho e objetivos	20
2. Materiais e Métodos.....	21
2.1 Meios de cultura	21
2.2 Trabalho Prévio	22

2.3	Trabalho realizado nesta dissertação	24
2.3.1	Isolamento por HPLC	24
2.3.2	Ensaio de atividade antimicrobiana.....	24
2.3.3	Estirpes bacterianas de <i>S. aureus</i>	25
2.3.4	Ensaio de atividade anti-biofilme.....	25
2.3.5	Técnicas para deposição de polímeros.....	26
2.3.5.1	Deposição de filmes por espalhamento	26
2.3.5.2	Eletrofiação.....	27
2.3.6	Ensaio de halos de inibição	27
2.3.7	Ensaio de tração.....	27
3.	Apresentação e discussão dos resultados	29
3.1	Avaliação da atividade anti-biofilme contra MRSA de amostras provenientes de actinobactérias.....	29
3.2	Desenvolvimento de um compósito polimérico com atividade antimicrobiana	41
3.2.1	Compósito polimérico com a tetraciclina como composto modelo	41
3.2.2	Atividade antimicrobiana de três compostos produzidos por actinobactérias	46
3.2.3	Compósitos poliméricos de HPC e compostos antimicrobianos provenientes de actinobactérias	51
3.2.4	Análise dos filmes obtidos por AFM (Microscopia de força atômica)	55
3.3.5	Ensaio de tração.....	58
4.	Conclusão e Perspectivas Futuras	61
5.	Referências Bibliográficas.....	63
6.	Anexos.....	71
	Anexos I – Compostos promissores pertencentes à estirpe PTM-346	71
	Anexos II – Compostos promissores pertencentes à estirpe PTM-420	73
	Anexos III – Cromatograma relativo à fração F2 da estirpe PTM-29	77

Índice de Figuras

1. Introdução

Figura 1.1 - Etapas de formação do biofilme	4
Figura 1.2 - Estrutura química do composto bonactina	10
Figura 1.3 - Estrutura química do composto diazepinomicina	10
Figura 1.4 - Estrutura química do composto 2-aliloxifenol.....	11
Figura 1.5 - Estrutura química do composto benzoisocromanequinona.....	11
Figura 1.6 - Imagens de microscopia ótica onde é possível comparar amostras não tratadas (C) com amostras tratadas com extrato bruto de CAA-3 (T)	12
Figura 1.7 – Estrutura química do composto estreptorubina B.....	13
Figura 1.8 - Estrutura química do composto actinomicina D	13
Figura 1.9 - Estrutura química do polímero HPC	14
Figura 1.10 - Estrutura química do polímero AC.....	15
Figura 1.11 - Sistema de Electrofiação.	15
Figura 1.12 - Curva tensão vs extensão característica de um material polimérico	17
Figura 1.13 - Comportamento mecânico para polímeros frágeis (A), plásticos (B) e elásticos (C)	17

2. Materiais e Métodos

Figura 2.1 - Contextualização do trabalho desenvolvido no âmbito do projeto “Tesouros Oceânicos -Sedimentos oceânicos do arquipélago da Madeira: nova fonte de compostos inovativos e bioativos”	22
Figura 2.2 – Equipamento utilizado para a produção dos filmes sólidos.....	26

3. Apresentação e Discussão dos Resultados

Figura 3.1 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme com os respetivos erros padrão associados a cada concentração do extrato PTM-384 registadas para a estirpe de <i>S. aureus</i> NCTC 8325.	30
Figura 3.2 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respetivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-346;F8+F9;F25 registadas para a estirpe de <i>S.aureus</i> NCTC 8325.	31
Figura 3.3 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respetivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-346;F8+F9;F62 registadas para a estirpe <i>S. aureus</i> NCTC 8325.	33

Figura 3.4 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respectivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-346;F8+F9;F64 registadas para a estirpe <i>S. aureus</i> NCTC 8325.	34
Figura 3.5 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respectivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-346;F8+F9;F34 registadas para a estirpe <i>S. aureus</i> WIS.	35
Figura 3.6 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respectivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-420;F5;F31 registadas para a estirpe <i>S. aureus</i> NCTC 8325.	38
Figura 3.7 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respectivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-420;F5;F42 registadas para a estirpe <i>S. aureus</i> NCTC 8325.	39
Figura 3.8 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respectivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-420;F5;F42 registadas para a estirpe <i>S. aureus</i> WIS.	39
Figura 3.9 - Halos de inibição obtidos, para as estirpes de <i>S. aureus</i> NCTC 8325, WIS, MW2 e HDE288, com discos comerciais de tetraciclina (30 µg/mL) e com discos de HPC com tetraciclina (30 µg/mL) provenientes de filmes finos sólidos.....	41
Figura 3.10 - Halos de inibição obtidos para as estirpes de <i>S. aureus</i> NCTC 8325, WIS, MW2 e HDE288, com discos comerciais de tetraciclina (30 µg/mL) e com discos de AC com tetraciclina (30 µg/mL) provenientes de filmes finos sólidos.....	42
Figura 3.11 – Halos de inibição obtidos, para as estirpes de <i>S. aureus</i> NCTC 8325, WIS, MW2 e HDE288, com discos comerciais de tetraciclina (30 µg/mL) e com discos de AC com tetraciclina (30 µg/mL) provenientes da técnica de electrofiação (deposição de 1 dia).	43
Figura 3.12 – Halos de inibição obtidos, para as estirpes de <i>S. aureus</i> NCTC 8325, WIS, MW2 e HDE288, com discos comerciais de tetraciclina (30 µg/mL) e com discos de AC com tetraciclina (30 µg/mL) provenientes da técnica de electrofiação (deposição de 3 dias).	44
Figura 3.13 – Halos de inibição obtidos, para as estirpes de <i>S. aureus</i> NCTC 8325, WIS, MW2 e HDE288, com discos comerciais de tetraciclina (30 µg/mL) e com discos de AC com tetraciclina (90 µg/mL) provenientes da técnica de electrofiação (deposição de 3 dias e solução com o triplo da quantidade de tetraciclina).	45
Figura 3.14 - Valor de absorvância (DO _{600nm}) da cultura de <i>S. aureus</i> WIS incubada com diferentes concentrações dos compostos puros PTM-29;F2;F29, PTM-29;F4;F39, PTM-420; F2+F3; F35 e Tetraciclina. São representados os valores médios (n=3) e o respetivo erro padrão associados a cada concentração.....	47
Figura 3.15 - Valor de absorvância (DO _{600nm}) da cultura de <i>S. aureus</i> MW2 testada com diferentes concentrações dos compostos puros PTM-29;F2;F29, PTM-29;F4;F39, PTM-420; F2+F3; F35 e Tetraciclina. São representados os valores médios (n=3) e o respetivo erro padrão associado a cada concentração.	48

Figura 3.16 - Valor de absorvância (DO_{600nm}) da cultura de <i>S. aureus</i> HDE288 testada com diferentes concentrações dos compostos puros PTM-29;F2;F29, PTM-29;F4;F39, PTM-420;F2+F3;F35 e Tetraciclina. São representados os valores médios ($n=3$) e o respectivo erro padrão associado a cada concentração.	49
Figura 3.17 - Valor de absorvância (DO_{600nm}) da cultura de <i>S. aureus</i> COL testada com diferentes concentrações dos compostos puros PTM-29;F2;F29, PTM-29;F4;F39, PTM-420;F2+F3;F35 e Tetraciclina. São representados os valores médios ($n=3$) e o respectivo erro padrão associado a cada concentração.	50
Figura 3.18 – Halos de inibição obtidos, para as estirpes de <i>S. aureus</i> WIS, MW2, HDE288 e COL com discos comerciais de tetraciclina (30 $\mu g/mL$), discos de HPC com tetraciclina (30 $\mu g/mL$) e discos de HPC com o composto puro PTM-420;F2+F3;F35 (Resultados registados 24 H após os ensaios e 50 dias depois).	51
Figura 3.19 – Estrutura química da tetraciclina. (a) Estrutura 2D; (b) Estrutura 3D.	52
Figura 3.20 – Estrutura química do composto puro PTM-420;F2+F3;F35. (a) Estrutura 2D; (b) Estrutura 3D.	52
Figura 3.21 – Estrutura química do composto puro PTM-29;F4;F39. (a) Estrutura 2D; (b) Estrutura 3D.	53
Figura 3.22 – Halos de inibição obtidos, para as estirpes de <i>S. aureus</i> WIS, MW2, HDE288 e COL com discos comerciais de tetraciclina (30 $\mu g/mL$), discos de HPC com tetraciclina (30 $\mu g/mL$) e discos de HPC com o composto puro PTM-29;F4;F39 (Resultados registados 24 H após os ensaios e 50 dias depois).	54
Figura 3.23- AFM obtido para o filme de HPC; (a) Imagem 2D; (b) Imagem 3D.....	55
Figura 3.24- AFM obtido para o filme de HPC com incorporação da tetraciclina; (a) Imagem 2D; (b) Imagem 3D.....	56
Figura 3.25-AFM obtido para o filme de HPC com incorporação do composto puro PTM-420; F2+F3; F35; (a) Imagem 2D; (b) Imagem 3D.....	56
Figura 3.26- AFM obtido para o filme de HPC com incorporação do composto puro PTM-29; F4; F39; (a) Imagem 2D; (b) Imagem 3D.	57
Figura 3.27-Curva típica tensão nominal – extensão nominal obtida no ensaio de tração do filme de HPC com incorporação da tetraciclina.	58

6. Anexos

Figura 6.1 - Gráficos relativos ao composto PTM-346;F8+F9;F26 que relacionam as concentrações de testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme das estirpes <i>S. aureus</i> NCTC 8325 (A) e WIS (B).	71
Figura 6.2 - Gráfico do composto PTM-346;F8+F9;F34 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de <i>S. aureus</i> NCTC 8325.	71

Figura 6.3 - Gráfico do composto PTM-346;F8+F9;62 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de <i>S. aureus</i> WIS (A) e HDE288 (B).	72
Figura 6.4 - Gráfico do composto PTM-346;F8+F9;63 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de <i>S. aureus</i> NCTC 8325 (A), WIS (B), MW2 (C) e HDE288 (D).	72
Figura 6.5 - Gráfico do composto PTM-346;F8+F9;64 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de <i>S. aureus</i> WIS (A) e HDE288 (B).	73
Figura 6.6 - Gráfico do composto PTM-420;F5;31 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de <i>S. aureus</i> WIS.	73
Figura 6.7 - Gráfico do composto PTM-420;F5;F38 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de <i>S. aureus</i> NCTC 8325 (A), WIS (B), MW2 (C) e HDE288 (D).	74
Figura 6.8 - Gráfico do composto PTM-420;F5;F42 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de <i>S. aureus</i> MW2 (A) e HDE288 (B).	75
Figura 6.9 - Gráfico do composto PTM-420;F5;F43 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de <i>S. aureus</i> NCTC 8325 (A) e WIS (B).	75
Figura 6.10 - Gráfico do composto PTM-420;F5;F45 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de <i>S. aureus</i> NCTC 8325 (A) e WIS (B).	76
Figura 6.11 - Gráfico do composto PTM-420;F5;F47 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de <i>S. aureus</i> NCTC 8325 (A), WIS (B) e MW2 (C).	76
Figura 6. 12 – Cromatograma relativo à fração F2 da estirpe PTM-29.	77

Índice de Tabelas

1. Introdução

Tabela 1.1 - Características das estirpes modelo para o estudo de <i>S. aureus</i>	8
Tabela 1.2 Materiais compósitos bioativos presentes no mercado.	19

2. Materiais e Métodos

Tabela 2.1 - Condições do HPLC da eluição da amostra PTM-29;F2.....	24
---	----

3. Apresentação e discussão dos resultados

Tabela 3.1 - Extratos brutos testados nesta dissertação.	29
Tabela 3.2 - Compostos puros da estirpe PTM-346 testados nesta dissertação. Destacados a negrito estão assinalados os compostos com resultados promissores.	31
Tabela 3.3 – Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe <i>S. aureus</i> NCTC 8325.....	32
Tabela 3.4 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe <i>S. aureus</i> WIS.....	32
Tabela 3.5 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe <i>S. aureus</i> MW2.	32
Tabela 3.6 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe <i>S. aureus</i> HDE288.	33
Tabela 3.7 - Compostos puros produzidos pela estirpe PTM-420 testados nesta dissertação. Destacados a negrito estão assinalados os compostos com resultados relevantes.	36
Tabela 3.8 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe <i>S. aureus</i> NCTC 8325.....	37
Tabela 3.9 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe <i>S. aureus</i> WIS.....	37
Tabela 3.10 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe <i>S. aureus</i> MW2.	37

Tabela 3.11 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe <i>S. aureus</i> HDE288.	37
Tabela 3.12 – Compostos puros testados nos ensaios de atividade antimicrobiana.	46
Tabela 3.13 - Concentração mínima inibitória (MIC), para as estirpes de <i>S.aureus</i> WIS, MW2, HDE288 e COL, obtida para os compostos puros PTM-29; F2; F29, PTM-29; F4, F39, PTM-420; F2+F3; F35 e para a tetraciclina.	47
Tabela 3.14 - Valores médios dos parâmetros obtidos através do ensaio de tração dos filmes de HPC e de HPC com incorporação da tetraciclina.	58

1. Introdução

1.1 *Staphylococcus aureus*

1.1.1 Descrição e importância clínica

Em 1880, o género *Staphylococcus* foi descrito pela primeira vez por Alexander Ogston e caracteriza-se por um padrão de divisão celular que resulta na formação de aglomerados de células, tipicamente em forma de cachos. Estas bactérias, gram-positivas em forma de cocos, apresentam um diâmetro entre 0,5 e 1,5 µm, não formam esporos e não possuem flagelo, sendo incapazes de se mover autonomamente. A sua temperatura ótima de crescimento varia entre 30 e 37°C e este género caracteriza-se por ser anaeróbio facultativo, ou seja, cresce em ambientes aeróbios ou em ambientes anaeróbios recorrendo à fermentação como fonte de energia (Haaber et al., 2016; Harris et al., 2002; Somerville and Proctor, 2009).

Pertencente a este género, *Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogénica oportunista mas também um micro-organismo comensal visto que pode ser encontrado nas fossas nasais e na pele de indivíduos saudáveis (Shin et al., 2013; Wang and Muir, 2016). A pele e as mucosas são excelentes barreiras contra a invasão por *S. aureus*, mas se qualquer uma destas for rompida devido a um trauma ou a uma cirurgia, este agente patogénico pode colonizar o tecido subjacente e provocar lesões características (Harris et al., 2002). Desde a sua descoberta, *S. aureus* pode infetar uma grande variedade de tecidos humanos, podendo provocar diversas manifestações clínicas, que podem ser pequenas infeções de pele até casos mais graves como meningite ou septicemia.

Atualmente, esta bactéria é também responsável pela maioria das infeções nosocomiais e constitui um grave problema de saúde pública devido à sua capacidade de adquirir resistência aos antibióticos e ao seu elevado número de fatores de virulência (Abraham and Jefferson, 2010). A sua parede celular é constituída por peptidoglicano (50%), ácidos teicóicos (40%) e proteínas de superfície (10%) como exoproteínas e autolisinas (Harris et al., 2002).

1.1.2 Os mecanismos de resistência aos antibióticos em *S. aureus*

As infeções hospitalares têm sido um dos principais flagelos mundiais na área da saúde. Com a introdução dos antibióticos, este problema parecia controlado, mas os micro-organismos desenvolveram mecanismos de resistência que tornam cada vez mais difícil a sua eliminação.

A penicilina foi descoberta em 1928 por Alexander Fleming (Fleming, 1929) e uns anos mais tarde, em 1940, foi o primeiro antibiótico utilizado para o tratamento de infeções por *S. aureus*. Até à introdução da penicilina, a taxa de mortalidade de pacientes infetados por *S. aureus* era de 80%, mas depois da utilização deste antibiótico, diminuiu drasticamente. Contudo, apenas dois anos depois, em 1942, surgiram as primeiras estirpes resistentes à

penicilina (Deurenberg et al., 2007). Tal resistência surgiu devido à aquisição de um plasmídeo que codifica a enzima penicilinase (uma β -lactamase), que hidrolisa o anel β -lactâmico e consequentemente inativa o antibiótico (Deurenberg et al., 2007; Fisher et al., 2005). Deste modo, foi necessário desenvolver novos antibióticos semi-sintéticos derivados da penicilina, como a meticilina. Todavia, apenas um ano após a sua introdução, em 1961, foram registradas as primeiras estipes resistentes a este antibiótico, devido à aquisição do gene *mecA*. Deste modo, surgiu a designação MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) para estirpes que adquirem o gene *mecA*, sendo estas estirpes responsáveis pela maioria das infecções adquiridas em ambiente hospitalar (HA-MRSA) em todo o mundo (Abraham and Jefferson, 2010; Deurenberg et al., 2007). Mais recentemente, estas bactérias disseminaram-se também na comunidade, afetando indivíduos saudáveis (CA-MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirido na comunidade). Muitos têm sido os antibióticos desenvolvidos para o tratamento de infecções por *S. aureus*, tais como, eritromicina (pertencente à classe dos macrólidos) e a tetraciclina (pertencente à classe das tetraciclinas) que têm como mecanismo de ação a inibição da síntese de proteínas (Fluit et al., 2001; Weisblum, 1995) e posteriormente a vancomicina (pertencente à classe dos glicopéptidos) que atua ao nível da síntese da parede celular (Smith et al., 1999). Nos últimos anos, foram introduzidas a daptomicina (classe dos lipopeptídeos cíclicos) e a linezolida (classe das oxazolidinonas) que têm como mecanismo de ação a inibição da síntese proteica. Contudo, estirpes resistentes à daptomicina foram registradas dois anos após a sua introdução e estirpes resistentes à linezolida foram registradas apenas um ano depois da sua utilização (Boucher and Sakoulas, 2007; Gu et al., 2013).

Os antibióticos β -lactâmicos inativam irreversivelmente as PBP's (Penicillin Binding Proteins), proteínas essenciais da síntese do peptidoglicano da parede celular, o que resulta na interrupção da sua síntese e na morte da bactéria (Roemer et al., 2013). A resistência à meticilina e a todos os antibióticos β -lactâmicos é conferida pelo gene *mecA*, que codifica para uma PBP extra, a PBP2a, que apresenta baixa afinidade para os antibióticos β -lactâmicos tornando estas bactérias resistentes (Couto et al., 2003). O gene *mecA* está localizado num elemento genético móvel, designado *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) e pensa-se que tenha sido adquirido a partir da espécie *Staphylococcus sciuri* (Berger-Bachi and Rohrer, 2002; Milheirico et al., 2007; Wu et al., 2001).

1.1.3 Fatores de virulência em *S. aureus*

Os fatores de virulência de *S. aureus* estão envolvidos em diversos processos, como a aderência deste a superfícies, a evasão do sistema imunitário do hospedeiro e a produção de toxinas, causando danos ao hospedeiro (Abraham and Jefferson, 2010). *S. aureus* detém vários fatores de virulência, particularmente a proteína A, a cápsula, as adesinas e as citotoxinas.

A proteína A está localizada na parede celular de *S. aureus* e tem capacidade de se ligar à região Fc das imunoglobulinas G (IgG), revestindo a superfície da célula com moléculas de

IgG na posição incorreta, destabilizando a fagocitose. A cápsula, tal como a proteína A, protege a bactéria contra a fagocitose (Foster, 2005).

As adesinas, como por exemplo as proteínas de ligação à fibronectina (*fnbA* e *fnbB*), as proteínas de ligação ao colagénio (*cna*) e as proteínas de ligação ao fibrinogénio (*fib*), ligam-se a recetores que existem nas células do hospedeiro e contribuem para a capacidade de *S. aureus* de aderir a superfícies, promovendo a colonização dos tecidos do hospedeiro (Greene et al., 1995; Tristan et al., 2003).

S. aureus possui ainda algumas citotoxinas como as hemolisinas e a leucocidinas. As primeiras dividem-se em quatro tipos - alfa, beta, delta, gama. Estas provocam a lise dos eritrócitos podendo ser importantes para a aquisição de nutrientes, nomeadamente de ferro (Dinges et al., 2000). As leucocidinas, entre as quais se distingue a PVL (*Panton-Valentine Leukocidin*), responsável pela pneumonia necrotizante hemorrágica, funcionam através da indução de poros na membrana das células do hospedeiro levando ao início da apoptose e consequentemente à morte celular (Gillet et al., 2002).

1.1.4 Formação de biofilmes por *S. aureus* – um importante fator de virulência

Atualmente, 75% das infeções microbianas em humanos advêm do desenvolvimento de biofilmes (Miquel et al., 2016). Os biofilmes são definidos como comunidades complexas de células microbianas envolvidas por matrizes poliméricas auto-sintetizadas, aderidas a superfícies bióticas (vivas) e abióticas (inertes) (Donlan and Costerton, 2002).

O ambiente hospitalar, onde existe uma elevada utilização de antibióticos e um elevado número de indivíduos com um sistema imunológico débil, constitui um ambiente favorável para o desenvolvimento de biofilmes e estes são cada vez mais reconhecidos pela comunidade de cuidados de saúde como sendo uma importante causa de infeções. As células bacterianas podem ser transmitidas através dos técnicos de saúde ou de dispositivos contaminados, tais como instrumentos cirúrgicos, cateteres, agulhas e endoscópios. Assim, estes são responsáveis pela maioria dos episódios de falha terapêutica em casos de transplantes ou introdução de implantes (Abdallah et al., 2014; Rosenthal et al., 2012; Wingender and Flemming, 2011).

1.1.4.1 Função fisiológica e fases de formação do biofilme

As bactérias podem desenvolver-se no estado planctónico, quando circulam isoladamente em meio líquido, ou sob a forma de biofilme, no qual se mantêm associadas a um suporte sólido. Neste estado as bactérias apresentam uma elevada tolerância a agentes antimicrobianos, por um lado porque se encontram num estado metabólico dormente, o que impede a ação da maioria dos antibióticos e por outro lado porque a penetração destes

agentes é impedida pela barreira de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (Donlan and Costerton, 2002; Lazazzera, 2005). Assim, os biofilmes têm como principal função a defesa das bactérias, protegendo-as contra tensões físicas e químicas, do stress externo e da fagocitose (Tutar et al., 2015).

A formação de biofilme envolve várias etapas (Figura 1.1): **(1)** Adesão bacteriana à superfície; **(2)** Formação de microcolônias; **(3)** Maturação do biofilme; **(4)** Dispersão do biofilme.

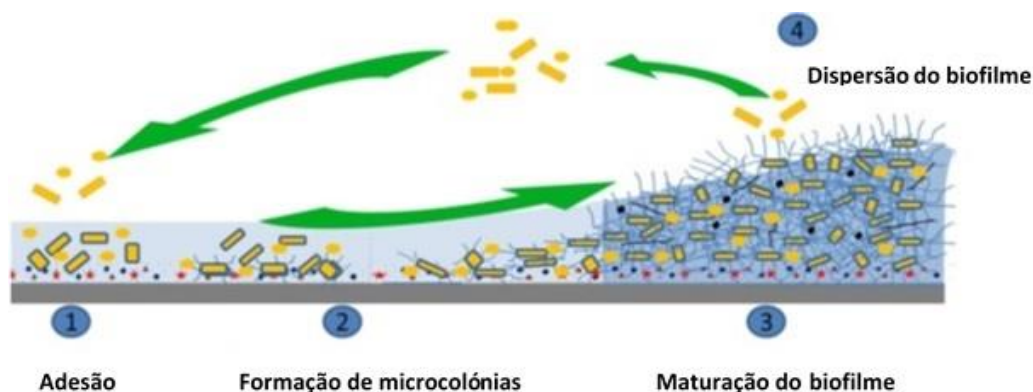


Figura 1.1 - Etapas de formação do biofilme; (1) Adesão bacteriana à superfície, (2) Formação de microcolônias, (3) Maturação do biofilme, (4) Dispersão do biofilme. Adaptado de (Abdallah et al., 2014).

A adesão bacteriana à superfície constitui o passo essencial para a formação do biofilme. Durante algum tempo esta etapa pode ser reversível, mas se as bactérias não forem removidas, torna-se irreversível. À medida que uma célula bacteriana se aproxima de uma superfície, a célula é exposta a forças físico-químicas, tais como forças de Van der Waals e interações electroestáticas. A adesão às superfícies abióticas também é influenciada pelo ambiente em torno das células, como a temperatura, a matéria orgânica e o pH (Bos et al., 1999; Renner and Weibel, 2011). Após a fixação, a adesão reversível torna-se irreversível, principalmente através da secreção de substâncias exopoliméricas (EPS) que formam a matriz do biofilme (Flemming and Wingender, 2010).

A terceira etapa tem como finalidade criar um biofilme maduro no qual as células são envolvidas numa matriz, que atua como uma estrutura de suporte para a estabilização da estrutura tridimensional do biofilme. Nesta etapa, a formação de biofilme está sob o controlo de vários sinais ambientais, tais como a temperatura e a disponibilidade de nutrientes (Dunne, 2002; Karatan and Watnick, 2009). Por último, a dispersão do biofilme representa uma oportunidade para as células sésseis se libertarem, contaminar outras superfícies e iniciar um novo ciclo. Esta etapa resulta de várias condições ambientais, tais como a disponibilidade de nutrientes, esgotamento de oxigénio e outras condições de stress (McDougald et al., 2012).

1.1.4.2 Composição e estrutura dos biofilmes de *S. aureus*

A matriz extracelular que compõe a estrutura dos biofilmes é constituída por uma mistura de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), nomeadamente polissacáridos, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos. Estas substâncias constituem aproximadamente 50-90% da matéria orgânica do biofilme e permitem às bactérias aderirem à superfície e entre si, fornecem estabilidade ao biofilme, formando uma estrutura coesa e tridimensional que interliga e imobiliza de forma transitória as células do biofilme. A composição da matriz do biofilme depende de algumas condições como a disponibilidade de nutrientes, da estirpe bacteriana e do estado de maturação do biofilme (Abdallah et al., 2014; Czaczyk and Myszka, 2007; Flemming and Wingender, 2010).

Em *S. aureus*, o principal exopolissacárido da matriz do biofilme é o poli-N-acetilglucosamina (PNAG) também denominado de PIA – polissacárido de adesina intercelular, que é importante para a formação de biofilme. A síntese deste polissacárido é mediada pelo locus *ica* do operão *icaADBC* que codifica a enzima IcaA N- acetilglucosaminil transferase, capaz de catalisar a síntese de PIA (Arciola et al., 2012; Cramton et al., 1999).

S. aureus tem capacidade de expressar uma variedade de proteínas de adesão, que permitem a união das células entre si e a colonização de um grande número de superfícies diferentes, como por exemplo as proteínas Bap (Cucarella et al., 2001), Aap (Rohde et al., 2007), SasG (Geoghegan et al., 2010), FnBPs (O'Neill et al., 2008) e proteína A (Merino et al., 2009). Para além de todas estas proteínas, estão ainda presentes na matriz dos biofilmes ácidos teicóicos (um glicopolímero da parede celular, carregado positivamente), também eles relacionados com a adesão e a colonização bacteriana (Abdallah et al., 2014; Arciola et al., 2012; Kurokawa et al., 2016).

Mais recentemente, foi descoberto ADN extracelular (eADNs) na constituição da matriz do biofilme. Este melhora a estrutura do biofilme aumentando a sua compactação e a sua degradação promove a dispersão do biofilme (Mann et al., 2009; Rice et al., 2007)

1.1.4.3 Estratégias anti-biofilme existentes

As estratégias anti-biofilmes podem ser divididas em dois tipos: a inibição/destabilização da formação de biofilmes e a disrupção/erradicação de biofilmes já formados e ligados de forma irreversível. Estas estratégias devem ser específicas, caso contrário, a sua utilização poderá alterar a composição dos ecossistemas e causar danos na microbiota benéfica (Miquel et al., 2016).

Atualmente, já foram desenvolvidas algumas substâncias ou tecnologias que apresentam atividade anti-biofilme, tais como, compostos de origem vegetal, enzimas, bacteriófagos, nanopartículas de prata e a tecnologia do plasma não térmico.

- Compostos de origem vegetal:

O aumento da resistência aos antibióticos de bactérias patogênicas resultou num aumento do interesse dos investigadores, para encontrar terapêuticas alternativas e novas moléculas bioativas.

O efeito de *Casbane diterpene* (CD), um diterpenóide isolado a partir da planta *Croton nepetaefolius*, em biofilmes de *S. aureus* foi testado e o composto perturbou significativamente o desenvolvimento dos biofilmes a concentrações acima de 125 µg/mL, mostrando que CD pode ser considerada uma molécula promissora com potencial farmacológico para o tratamento de infeções associadas a biofilmes de *S. aureus* (Carneiro et al., 2011).

Para além do composto referido anteriormente, extratos de várias plantas, como *Sanguisorba officinalis* (Chen et al., 2015), *Quercus cerris* (Hobby et al., 2012) e *Azadirachta indica* (Quelemes et al., 2015), utilizadas na medicina tradicional tem revelado atividade contra biofilmes de MRSA, sendo estes uma aposta para o desenvolvimento de novos medicamentos.

- Enzimas:

Uma vez que a matriz do biofilme é composta de ADN, proteínas e polissacáridos extracelulares, estudos recentes indicam que a rutura da estrutura do biofilme pode ser conseguida através da degradação dos compostos individuais da matriz do biofilme por várias enzimas. Enzimas como a DNase I, a Lisostafina e a Dispersina B, já demonstraram ter atividade contra biofilmes de *S. aureus*.

A DNase I é uma enzima capaz de hidrolisar as moléculas de ADN rompendo as ligações fosfodiéster. Esta enzima possui uma forte atividade sobre as estruturas dos biofilmes de *S. aureus*, diminuindo a biomassa da matriz formada ou através da formação de um biofilme com ligações mais fracas (Tetz et al., 2009).

A Lisostafina é uma endopeptidase que degrada a parede celular de *S. aureus* levando rapidamente à lise das bactérias. Esta enzima tem um elevado potencial na prevenção e tratamento de biofilmes de *S. aureus*, como o tratamento de infeções estabelecidas por dispositivos internos, bem como para proteger esses dispositivos da fixação de bactérias e posterior formação de biofilme (Kokai-Kun et al., 2009).

A Dispersina B é uma N-acetilglucosamidase que degrada o principal exopolissacárido que constitui a matriz do biofilme de *S. aureus*, o poli-N-acetilglucosamina (PNAG). A dispersina B pode ser usada como um agente anti-biofilme em combinação com antibióticos para o tratamento de infeções bacterianas (Ammons, 2010).

- Bacteriófagos:

Os bacteriófagos são vírus bacterianos que devido à sua capacidade de lisar bactérias, têm interesse para a área de controlo dos biofilmes. A eficiência dos

bacteriófagos foi demonstrada através da ruptura da matriz do biofilme e da lise das células bacterianas associadas ao biofilme. (Ammons, 2010).

- Nanopartículas de prata:

A prata é um metal com propriedade antibacterianas, não tóxico que pode ser utilizado na área da medicina. Estudos realizados com nanopartículas de prata, revelaram que a adição de concentrações crescentes destas nanopartículas reduzem a capacidade das bactérias em formar biofilme (Mohanty et al., 2012; Taraszkievicz et al., 2013).

A superfície do biofilme pode ser quimicamente modificada pela adição de nanopartículas. Estas exercem atividade antibacteriana ao interagirem electrostaticamente com a membrana bacteriana e consequentemente, a disromperem (Miquel et al., 2016).

- Tecnologia do plasma não térmico:

O plasma é um estado único da matéria, similar ao gás. Neste caso é utilizada a eletricidade de alta pressão, no qual as partículas são ionizadas. Devido à baixa toxicidade para os tecidos humanos, esta técnica é uma ferramenta muito promissora para a prevenção de biofilmes e controle da descontaminação de materiais biológicos (Miquel et al., 2016).

Existem três abordagens para a modificação de superfícies para reduzir infecções associadas a biofilmes. A primeira baseia-se na incorporação de agentes microbiocidas, tais como antibiótico, nanopartículas de prata ou clorexidina que matam as células bacterianas ligadas à superfície, interrompendo a colonização superficial. O segundo método consiste na modificação da superfície para prevenir a aderência das bactérias, alterando características importantes como a química superficial, o tamanho e a distribuição dos poros e a rugosidade. Por fim, a terceira estratégia consiste na inibição do processo molecular de formação de biofilme.(Ermolaeva et al., 2015; Joshi et al., 2010).

1.1.5 Estirpes modelo para o estudo de *S. aureus*

Nesta dissertação foram utilizadas cinco estirpes de *S. aureus*. Inicialmente a estirpe utilizada neste estudo foi a MSSA NCTC 8325. Esta foi isolada em 1943 num laboratório em Oxford. É uma estirpe laboratorial, geralmente utilizada como modelo para a investigação em *S. aureus* (Baba et al., 2002; Novick, 1967).

Foram também utilizadas quatro estirpes de *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA), nomeadamente as estirpes WIS, MW2, HDE288 e COL.

A estirpe MRSA WIS foi isolada na Austrália em 1999 e possui uma SCCmec tipo V. Já a estirpe MW2 foi isolada nos Estados Unidos, após causar septicemia fatal a uma criança, em 1998 e dispõe de uma SCCmec tipo IV. Ambas as estirpes são CA-MRSA, ou seja,

Staphylococcus aureus resistente à meticilina adquirida na comunidade (Baba et al., 2002; Ito et al., 2004; O'brien et al., 1999).

A estirpe HDE288 é originária do clone pediátrico, isolado no Hospital Dona Estefânia, em Portugal, no ano de 1996 e possui uma SCCmec tipo VI. Por outro lado, a estirpe COL foi isolada em 1965 no Reino Unido e tem uma SCCmec tipo I. As duas últimas estirpes são HA-MRSA, isto é, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirido em ambiente hospitalar (Figueiredo et al., 2014; Oliveira et al., 2001; Sá-Leão, 1999).

As cassetes SCCmec do tipo IV e V são encontradas tipicamente em estirpes CA-MRSA enquanto que as SCCmec tipo I e VI são características de estirpes HA-MRSA. Estes dois grupos de linhagens genéticas de *S. aureus*, os HA e os CA-MRSA apresentam características distintas, como o facto de as estirpes CA-MRSA adquirirem cassetes SCCmec mais pequenas e mais fáceis de transferir (Figueiredo et al., 2014). Para além disso, CA-MRSA apresentam maior virulência e são suscetíveis a uma variedade de antibióticos não β -lactâmicos, enquanto que as estirpes HA-MRSA são resistentes a múltiplos antibióticos (Baba et al., 2002). Esta informação encontra-se resumida na tabela seguinte (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Características das estirpes modelo para o estudo de *S. aureus*.

Estirpe	MSSA/ HA/CA- MRSA	Ano de Isolamento	Origem	SCCmec tipo	Referência Bibliográfica
NCTC 8325	MSSA	1943	Oxford	-	(Novick, 1967)
WIS	CA-MRSA	1999	Austrália	V	(O'brien et al., 1999)
MW2	CA-MRSA	1998	Estados Unidos	IV	(Baba et al., 2002)
HDE288	HA-MRSA	1996	Portugal	VI	(Sá-Leão, 1999)
COL	HA-MRSA	1965	Reino Unido	I	(Oliveira et al., 2001)

1.2 Actinobactérias e a importância dos seus compostos bioativos

Pertencentes à ordem *Actinomycetales*, as actinobactérias ou actinomicetas são bactérias gram-positivas e apresentam um elevado conteúdo G-C no seu ADN (Lam, 2006; Mincer et al., 2002). Estas são responsáveis pela produção de metabolitos secundários bioativos bastante importantes para a indústria farmacêutica, como os antibióticos. Em 1940, surgiu o primeiro antibiótico proveniente de actinobactérias – a actinomicina - e até à década de 80, estas foram responsáveis por 70% dos antibióticos existentes (Mincer et al., 2002).

Até ao final da década de 80, uma vasta gama de antibióticos e metabolitos bioativos foram obtidos de actinobactérias terrestres, com consequente diminuição da descoberta de novos compostos bioativos proveniente destas bactérias, uma vez que este recurso foi exaustivamente explorado (Subramani and Aalbersberg, 2012). Assim, tornou-se crucial encontrar uma fonte de novos medicamentos, principalmente antibióticos, estudando grupos de actinobactérias de habitats inexplorados (Lam, 2006).

O ecossistema marinho é um ambiente pouco explorado que apresenta uma notável diversidade de micro-organismos. Os mares e os oceanos representam 70% da superfície do nosso planeta, acrescentando uma dimensão importante à pesquisa de novos produtos naturais, economicamente e biotecnologicamente valiosos (Bull and Stach, 2007; Lam, 2006; Manivasagan et al., 2013).

Como as condições ambientais marinhas são extremamente diferentes das terrestres, supõe-se que as actinobactérias marinhas têm características diferentes das dos seus homólogos terrestres e, portanto, podem produzir diferentes compostos bioativos (Lam, 2006). Entre as condições extremas a que as actinobactérias têm de se adaptar podem ser destacadas: pressão elevada (máximo de 1100 atm), baixa temperatura no mar profundo ou temperaturas superiores a 100°C perto de fontes hidrotermais, falta de luz, salinidade e concentração de oxigénio variáveis (Manivasagan et al., 2013).

Em 1984 foi relatada a descoberta da primeira actinobactéria marinha - *Rhodococcus marinonascens*. Desde então vários géneros de actinobactérias indígenas dos oceanos foram descritas como *Dietzia*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinispora*, *Micromonospora* (Manivasagan et al., 2013).

A descoberta destes géneros de actinobactérias permitiu a obtenção de novos metabolitos com propriedades anticancerígenas, antimicrobianas e imunossupressoras (Lam, 2006; Manivasagan et al., 2013).

1.2.1 Compostos antimicrobianos produzidos por actinobactérias

São exemplos de antimicrobianos produzidos por actinobactérias os compostos 2 – aliloxifenol, higromicina, marinomicinas A – D, estreptomina, tetraciclina, bonactina, piridínio, tiocoralina, benzoisocromanequinona, diazepinomicina, eremomicina, duraimicina e saptomicina. Seguidamente, são destacados alguns destes compostos que apresentaram atividade contra bactérias gram-positivas, nomeadamente *S. aureus* (Manivasagan et al., 2014a; Manivasagan et al., 2013, 2014b; Solanki et al., 2008).

Segundo Schumacher et al, o composto bonactina (Figura 1.2) proveniente de *Streptomyces* sp. BD21-2, obtido a partir de sedimentos marinhos da praia Kailua, Hawaii, demonstra atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, nomeadamente *S. aureus* (Schumacher et al., 2003).

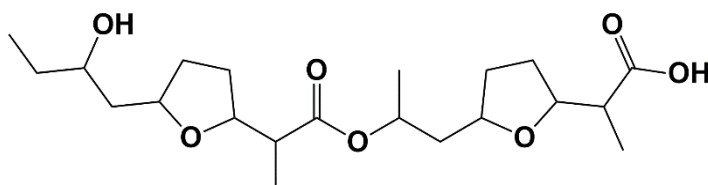


Figura 1.2 - Estrutura química do composto bonactina (Schumacher et al., 2003).

De acordo com Charan et al, o metabolito diazepinomicina (Figura 1.3), isolado de *Micromonospora* DPJ12, obtida de sedimentos da ilha de Shishijima, no Japão, representa uma classe molecular única composta por um núcleo de dibenzodiazepina ligada a uma cadeia lateral de farnesilo. A estrutura do núcleo é excepcionalmente rara na natureza e demonstra atividade antimicrobiana moderada contra bactérias gram-positivas com MICs de aproximadamente 32 µg/mL (Charan et al., 2004).

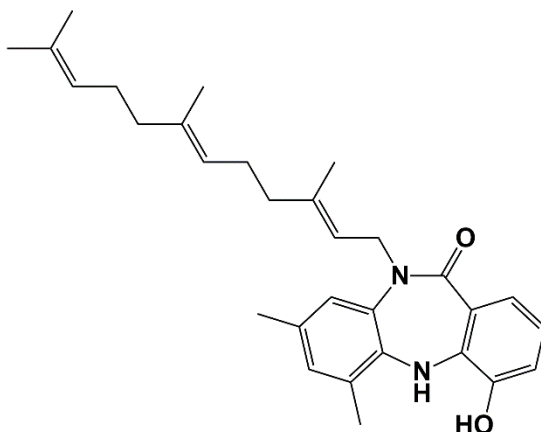


Figura 1.3 - Estrutura química do composto diazepinomicina (Charan et al., 2004).

Segundo Arumugam et al, o composto 2-aliloxifenol (Figura 1.4) foi obtido, pela primeira vez através do isolamento de *Streptomyces* MS1/7 na Baía de Bengala, Índia. Este revelou ter propriedade antimicrobianas ao inibir o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas, nomeadamente *S. aureus* (Arumugam et al., 2010).

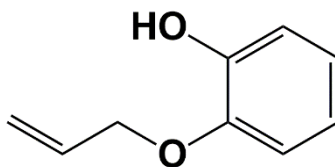


Figura 1.4 - Estrutura química do composto 2-aliloxifenol (Arumugam et al., 2010).

O composto benzoisocromanequinona (Figura 1.5) foi descrito por Govindarajan et al, tendo sido isolado de *Streptomyces* sp. JRG-04 a partir de amostras recolhidas em Tamil Nadu, Índia. Este composto revelou a capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos patogénicos incluindo *S. aureus* resistente à metilina (Govindarajan et al., 2014).

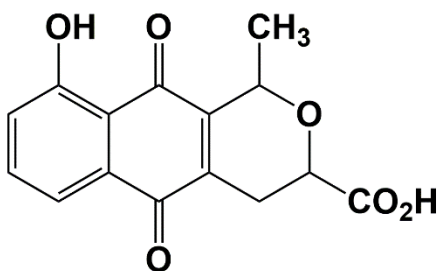


Figura 1.5 - Estrutura química do composto benzoisocromanequinona (Govindarajan et al., 2014).

1.2.2 Metabolitos secundários produzidos por actinobactérias com atividade anti-biofilme

Staphylococcus aureus é atualmente responsável pela maioria das infecções nosocomiais e por muitas infecções derivadas da formação de biofilme em dispositivos médicos. A sua crescente resistência aos antibióticos, em parte, atribuída à sua capacidade para formar biofilmes, é um desafio para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Em 2010, Bakkiyaraj e Pandian revelaram o primeiro estudo que demonstra a atividade anti-biofilme de uma actinobactéria (*Streptomyces akiyoshiensis*) associada a um coral (CAA-3), contra biofilmes de *S. aureus*, suscetível à meticilina (MSSA), resistente à meticilina (MRSA) e isolados clínicos. Este estudo revelou ser bastante promissor, uma vez que uma amostra de extrato bruto de CAA-3 mostrou reduzir a formação de biofilme de todas as estirpes testadas, como é possível observar através de imagens de microscopia ótica (Figura 1.6) onde é possível comparar amostras dos controlos não tratados (C) com amostras tratadas com extrato bruto de CAA-3 (T) (Bakkiyaraj and Pandian, 2010).

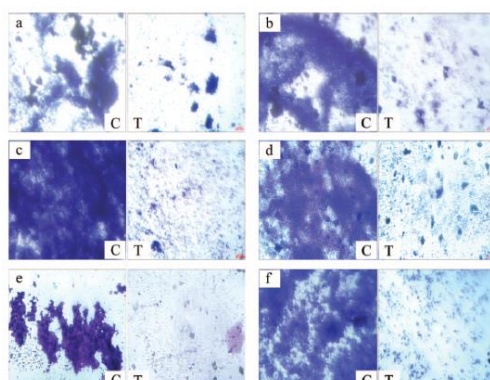


Figura 1.6 - Imagens de microscopia ótica onde é possível comparar amostras não tratadas (C) com amostras tratadas com extrato bruto de CAA-3 (T); (a) MSSA; (b) MRSA; (c) (d) (e) (f) isolados clínicos (Bakkiyaraj and Pandian, 2010).

Estreptorubina B é outro composto promissor com atividade anti-biofilme (Figura 1.7), conforme descrito por Suzuki et al. Este composto obtido a partir de *Streptomyces* sp. MC11024, isolada no Japão, mostrou ser um potente inibidor a formação de biofilme de *S. aureus* MRSA N315 para um valor de IC₅₀ de 0,22 µg/mL (0,56 µM) (Suzuki et al., 2015).

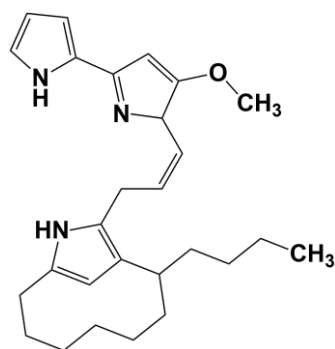


Figura 1.7 – Estrutura química do composto estreptorubina B (Suzuki et al., 2015).

De acordo com Younis et al, metabólitos secundários produzidos por estirpes marinhas halófilas de *Streptomyces* possuem propriedades anti-biofilme contra *Proteus mirabilis*. Esta bactéria gram-negativa é comumente encontrada em cateteres urinários infectados. Neste estudo foi testada a atividade dos extratos brutos obtidos de estirpes de *Streptomyces* isoladas a partir de sedimentos marinhos de diferentes locais do Iraque contra um isolado clínico que apresenta maior capacidade para formar biofilme e para resistir aos antibióticos (UCB4A). Verificou-se que os extratos testados diminuíram a formação de biofilme. (Younis et al., 2016)

Segundo Lee et al, a actinomicina D (Figura 1.8), isolada a partir *Streptomyces parvulus*, possui propriedades anti-biofilme. Neste estudo foi avaliada a atividade anti-biofilme deste composto contra três estirpes de *S. aureus* (MSSA ATCC 25923, MSSA ATCC 6538 e MRSA ATCC 33591), do qual foi possível constatar que uma concentração de 0,1 µg/mL inibe a formação de biofilme em cerca de ~ 70% - 80%.

Este estudo demonstra também a eficácia anti-biofilme da actinomicina D ao ser introduzida em revestimentos de PLGA (poli (L- ácido láctico-co-ácido glicólico)), uma vez que reduziu acentuadamente a formação de biofilme em superfícies de vidro contra as diferentes estirpes de *S. aureus*. Estes resultados sugerem pesquisas futuras sobre a utilização deste composto em revestimentos de materiais médicos (Lee et al., 2016).

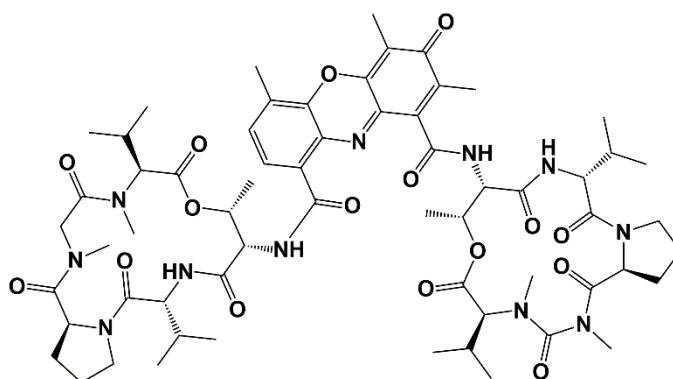


Figura 1.8 - Estrutura química do composto actinomicina D (Lee et al., 2016).

1.3 Biopolímeros

Os polímeros são macromoléculas constituídas pela repetição de unidades químicas pequenas e simples (monómeros) unidas entre si por ligações covalentes. Estes podem ser de origem sintética como o polietileno ou de origem natural, como a hidroxipropilcelulose e o acetato de celulose.

Os biopolímeros são conhecidos pela sua versatilidade bem como pelas suas propriedades térmicas e mecânicas (Canejo et al., 2008). A escolha de um polímero para fins biomédicos tem de ter em consideração a sua biocompatibilidade e a sua baixa imunogenicidade, para poder ser utilizado de forma segura em ambiente biológico (Bhardwaj and Kundu, 2010). Também a sua biodegradabilidade é importante, para que o polímero se degrade e não seja necessário qualquer intervenção para posteriormente ser removido do organismo (Ruggiero et al., 2015).

1.3.1 Polímeros solúveis em água – Hidroxipropilcelulose

O polímero hidroxipropilcelulose é um éter derivado da celulose, que pode ser sintetizado por substituição com grupos éter de hidroxipropilo, cuja estrutura molecular está representada na Figura 1.9 (Aytac et al., 2015; Ogawa et al., 2014). É um polímero solúvel em água, biocompatível e biodegradável (Larsson et al., 2010). HPC é usualmente utilizado em áreas científicas, tais engenharia biomédica (ex. produção de hidrogéis) e a biotecnologia (Aytac et al., 2015).

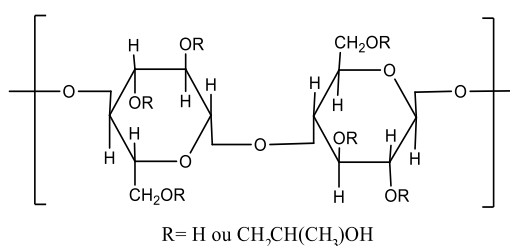


Figura 1.9 - Estrutura química do polímero HPC (Ogawa et al., 2014).

1.3.2 Polímeros insolúveis em água - Acetato de celulose

O polímero acetato de celulose (AC) é um éster da celulose, cuja estrutura química esta representada na Figura 1.10 (Ferrarezi et al., 2013; Konwarh et al., 2013). É um material de baixo custo uma vez que é produzido a partir de materiais ricos em celulose, tais como algodão ou madeira. É um polímero biocompatível e insolúvel (Ruggiero et al., 2015), que pode ser utilizado para a produção de filtros, membranas e sistemas de isolamento (Ferrarezi et al., 2013).

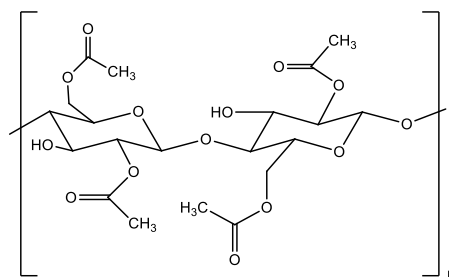


Figura 1.10 - Estrutura química do polímero AC (Konwarh et al., 2013).

1.4 Electrofiação

A Electrofiação é uma técnica simples, versátil e de baixo custo utilizada para a produção de fibras a partir de soluções poliméricas. Este método, patenteado em 1934 por Formhals, toma partido da existência de forças eletrostáticas entre dois pontos, a diferentes potenciais, para fabricar fibras com diversos diâmetros (nm- μ m) e uma elevada área superficial em relação ao seu volume (Aytac et al., 2015; Bhardwaj and Kundu, 2010).

Um sistema de electrofiação com o representado na Figura 1.11, é constituído por uma fonte de tensão, uma seringa com uma agulha ligada a esta fonte, um alvo coletor ligado à terra e uma bomba de injeção que permite controlar o caudal da solução polimérica. Esta solução é submetida a um campo elétrico que, à medida que a solução é injetada pela bomba, permite estabelecer uma diferença de potencial eléctrico entre a ponta da agulha e o alvo coletor. À medida que a tensão aplicada aumenta, forma-se na ponta da agulha uma estrutura denominada cone de Taylor. Quando o campo elétrico atinge um valor crítico, as forças electroestáticas ultrapassam as forças de tensão superficial no cone de Taylor, e forma-se um jato de solução que se dirige para o coletor. Durante este percurso, ocorre a formação de fibras já que o solvente evapora e o jato prolonga-se até ao alvo coletor, ocorrendo uma diminuição do seu diâmetro por estiramento (Bhardwaj and Kundu, 2010).

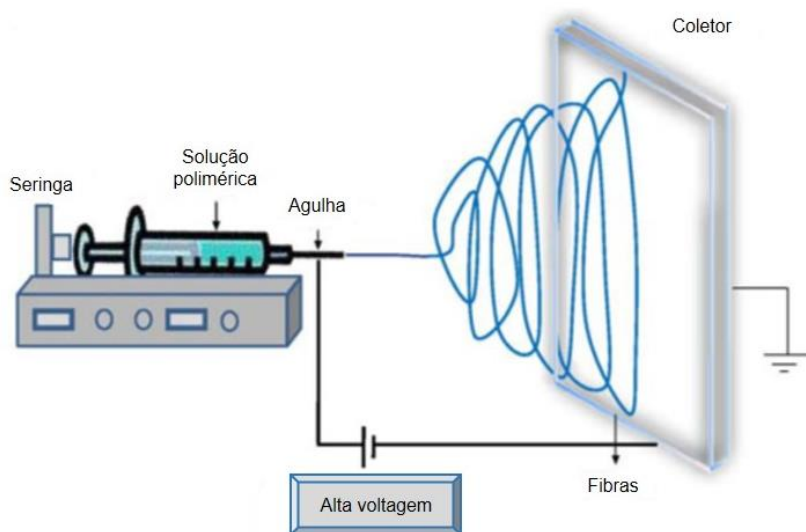


Figura 1.11 - Sistema de Electrofiação (Adaptado de (Bhardwaj and Kundu, 2010)).

Os parâmetros críticos que afetam as características das fibras obtidas sendo que estes podem ser divididos em três grupos:

- Parâmetros da solução: tipo de polímero, peso molecular, concentração do polímero, tipo de solvente, viscosidade da solução, a condutividade e tensão superficial;
- Parâmetros do processo: distância da ponta da agulha ao coletor, espessura da agulha, tensão aplicada, taxa de fluxo (caudal);
- Parâmetros ambientais: temperatura e humidade.

Nas últimas décadas, esta técnica tem sido aplicada nas áreas da biomedicina e engenharia de tecidos, como por exemplo na produção de tecidos (com fibras alinhadas ou desalinhadas), biossensores, membranas, catalisadores, cicatrização de feridas, libertação controlada de fármacos, imobilização de enzimas e vestuário de proteção (Bhardwaj and Kundu, 2010; Shukla et al., 2005).

1.5 Caracterização mecânica de polímeros

As propriedades mecânicas dos polímeros podem ser avaliadas através da realização de ensaios de tração. Estes consistem na aplicação de uma força uniaxial sobre um corpo de prova, provocando o seu alongamento até à rutura.

A tensão nominal (σ) pode ser definida como o quociente entre a força aplicada (F) e a área inicial da seção transversal do corpo de prova (A_0):

$$\sigma = \frac{F}{A_0}$$

A extensão (ε) pode ser obtida dividindo a variação do comprimento (ΔL) pelo comprimento inicial (L_0):

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0}$$

A representação gráfica da variação da tensão com a extensão permite obter a curva característica para um material polimérico (Figura 1.12).

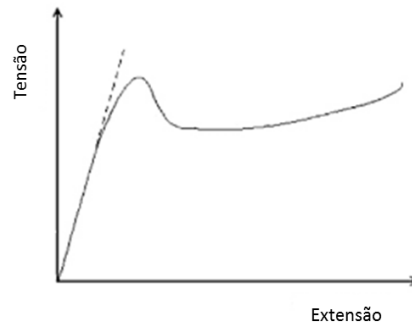


Figura 1.12 - Curva tensão vs extensão característica de um material polimérico (Hibbeler, 2004).

Na Figura 1.12, a região linear inicial é denominada região de comportamento elástico, onde a extensão do material é diretamente proporcional à tensão aplicada, sendo esta proporcionalidade denominada por lei de *Hooke* ($\sigma = E \epsilon$). Através da lei de Hooke, é possível determinar a constante de elasticidade do material através do módulo de *Young* (E), que corresponde ao declive da reta nesta região de comportamento linear elástico. Após terminar a zona linear é possível observar uma curva que resulta do comportamento plástico do material, durante o qual o material apresenta uma deformação permanente. Quando a carga é removida enquanto o comportamento é puramente elástico, o material recupera totalmente as dimensões iniciais. Quando a remoção da carga é efetuada na zona de comportamento plástico existe uma ligeira recuperação do comprimento, aquando da remoção da carga que corresponde à recuperação elástica do material, mas o material não retoma as suas dimensões iniciais, mantendo uma deformação permanente (Hibbeler, 2004).

Os materiais em geral podem apresentar três tipos de comportamento mecânico (Figura 1.13) (Callister Jr., 2008).

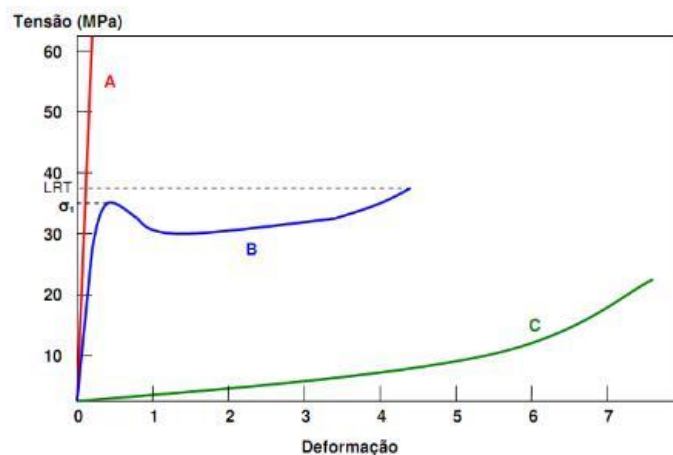


Figura 1.13 - Comportamento mecânico para polímeros frágeis (A), plásticos (B) e elásticos (C) (Callister Jr., 2008).

- Polímeros frágeis: O comportamento deste tipo de polímeros é um comportamento frágil, o que significa que este fratura enquanto se deforma elasticamente, não suportando deformação plástica;
- Polímeros plásticos: O comportamento plástico de um material polimérico é semelhante ao de muitos materiais metálicos. A região inicial é elástica, e esta é seguida pelo escoamento e por uma região de deformação plástica. Neste caso, o limite de resistência à tração (LRT) corresponde à tensão onde ocorre a fratura;
- Polímeros elásticos: A deformação que ocorre é totalmente elástica, sendo esta classe de polímeros também designada de elastómeros. Ao contrário dos materiais frágeis, apresentam baixos módulos de *Young* e permitem grandes deformações antes da fratura.

1.6 Materiais compósitos bioativos existentes atualmente

Nos últimos anos, devido ao desenvolvimento e propagação de estirpes de bactérias resistentes aos antibióticos surgiu a necessidade de utilizar materiais compósitos com propriedades antimicrobianas. A sua aplicação tem como intuito minimizar o crescimento de micro-organismos em feridas e melhorar as condições para uma rápida cicatrização.

Atualmente, existem diversos materiais compósitos, comercializados, que têm como princípio ativo a utilização de prata ou iodo, uma vez que ambos são poderosos agentes antimicrobianos (Abdelrahman and Newton, 2011; Vowden and Vowden, 2014). Embora estes materiais compósitos sejam um grande avanço no auxílio da cicatrização de feridas contaminadas por agentes patogénicos, apresentam algumas desvantagens como a necessidade de remover o penso, o que pode provocar danos/trauma na ferida, o facto de alguns destes pensos precisarem de um penso secundário para fixação e possuem períodos de utilização limitados, devido ao perigo de toxicidade. Alguns dos materiais compósitos existentes no mercado encontram-se descritos na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 Materiais compósitos bioativos presentes no mercado.

Nome comercial	Mecanismo de ação
MEPILEX® AG 	<ul style="list-style-type: none"> - Penso de espuma antimicrobiano para feridas agudas e crônicas com sinais de infecção; - Atividade antimicrobiana com tecnologia à base de prata. <p>(http://www.molnlycke.pt/tratamento-feridas-produtos-avancados/produtos-antimicrobianos/mepilex-ag/#confirm - consultado a 21/6/16)</p>
Atrauman® Ag 	<ul style="list-style-type: none"> - Compressa de poliamida coberta com prata metálica; - Eficiente contra um largo espectro de bactérias gram-positivas incluindo <i>S.aureus</i> MRSA. <p>(http://pt.hartmann.info/images/10_1_-_Atrauman_Ag_-_O_unico_penso_de_prata_suave_na_ferida.pdf - consultado a 21/6/16)</p>
AQUACEL® Ag+ EXTRA 	<ul style="list-style-type: none"> - Penso de hidrofibra revolucionário que se destaca pela sua nova tecnologia AG+, que potência a ação microbiana da prata iônica, com eficácia contra a formação de biofilmes. <p>(https://www.farmaciasportuguesas.pt/catalogo/index.php/catalog/product/view/id/643714/s/aquacel-ag-extra-penso-esteril/category/333/ - consultado a 21/6/16)</p>
ACTICOAT 	<ul style="list-style-type: none"> - Pensos baseados em prata nanocristalina; - Indicado como barreira antimicrobiana em feridas superficiais ou profundas, tais como queimaduras. <p>(http://www.medicalexpress.net/smith-newphew-penso/pensos-de-prata-nanocristalina.html - consultado a 21/6/16)</p>
Inadine® 	<ul style="list-style-type: none"> - Tecido de malha impregnado com uma base de polietilenoglicol (PEG) e iodopovidona (derivado do iodo); - A iodopovidona tem ação antimicrobiana e tem provado ser eficiente contra MRSA. <p>(http://www.factormed.pt/pt/catalogo/penso-/pensos-iodopovidona/inadine-penso-estril-iodopovidona/ - consultado a 21/6/16)</p>
Iodosorb® 	<ul style="list-style-type: none"> - Liberação de iodo de forma controlada para monitorizar e eliminar os micro-organismos. <p>(http://feridas.smith-nephew.pt/pro-iodosorb.html - consultado a 21/6/16)</p>

1.7 Contextualização do trabalho e objetivos

Apesar das diversas classes de antibióticos introduzidas na prática clínica, as estirpes de MRSA continuam constantemente a adquirir resistência, representando uma grande ameaça para a saúde pública. Assim, torna-se fundamental desenvolver novos agentes antimicrobianos e também novos métodos de tratamento.

Deste modo, as actinobactérias marinhas, mais precisamente o estudo dos seus compostos bioativos, podem contribuir para a descoberta de novos produtos com um importante valor biotecnológico.

Neste trabalho, os principais objetivos foram:

- Avaliar a atividade anti-biofilme de 7 extratos brutos e de 49 compostos puros (11 da estirpe PTM-346 e 38 da estirpe PTM-420), provenientes de actinobactérias, contra uma estirpe de MSSA (NCTC 8325) e três estirpes de MRSA (WIS, MW2 e HDE288);
- Incorporar compostos com atividade antimicrobiana em polímeros solúveis em água, tendo como finalidade o desenvolvimento de um compósito polimérico que possa ser aplicado em feridas ou queimaduras infectadas por MRSA. Este compósito pretende representar um novo avanço no mercado de compósitos bioativos corrente. Apresenta como principal inovação ser constituído com base em produtos naturais e não necessitar de ser removido, evitando assim o trauma na ferida.

2. Materiais e Métodos

2.1 Meios de cultura

As estirpes de actinobactérias marinhas foram propagadas em meio de cultura A1 (25% (v/v) de água bidestilada, 75% (v/v) de água do mar filtrada, 1% (m/v) de amido (Dickinson and Company, França), 0,4% (m/v) extrato de levedura (Dickinson and Company, França), 0,2% (m/v) de peptona (Dickinson and Company, França) e 1,8% (m/v) de agar (meio sólido)).

As estirpes de *S. aureus* foram propagadas em meio de cultura líquido Tryptic Soy Broth (TSB, Applichem, Alemanha) ou sólido Tryptic Soy Agar (TSA) com 1,5% (m/v) de agar.

2.2 Trabalho Prévio

Este trabalho foi realizado no seguimento do projeto “Tesouros Oceânicos -Sedimentos oceânicos do arquipélago da Madeira: nova fonte de compostos inovativos e bioativos” (PTDC/QUI-QUI/119116/2010). Atendendo a que as amostras testadas nesta dissertação foram obtidas no âmbito deste projeto, torna-se necessário fazer uma contextualização, como a apresentada de seguidamente (Figura 2.1).

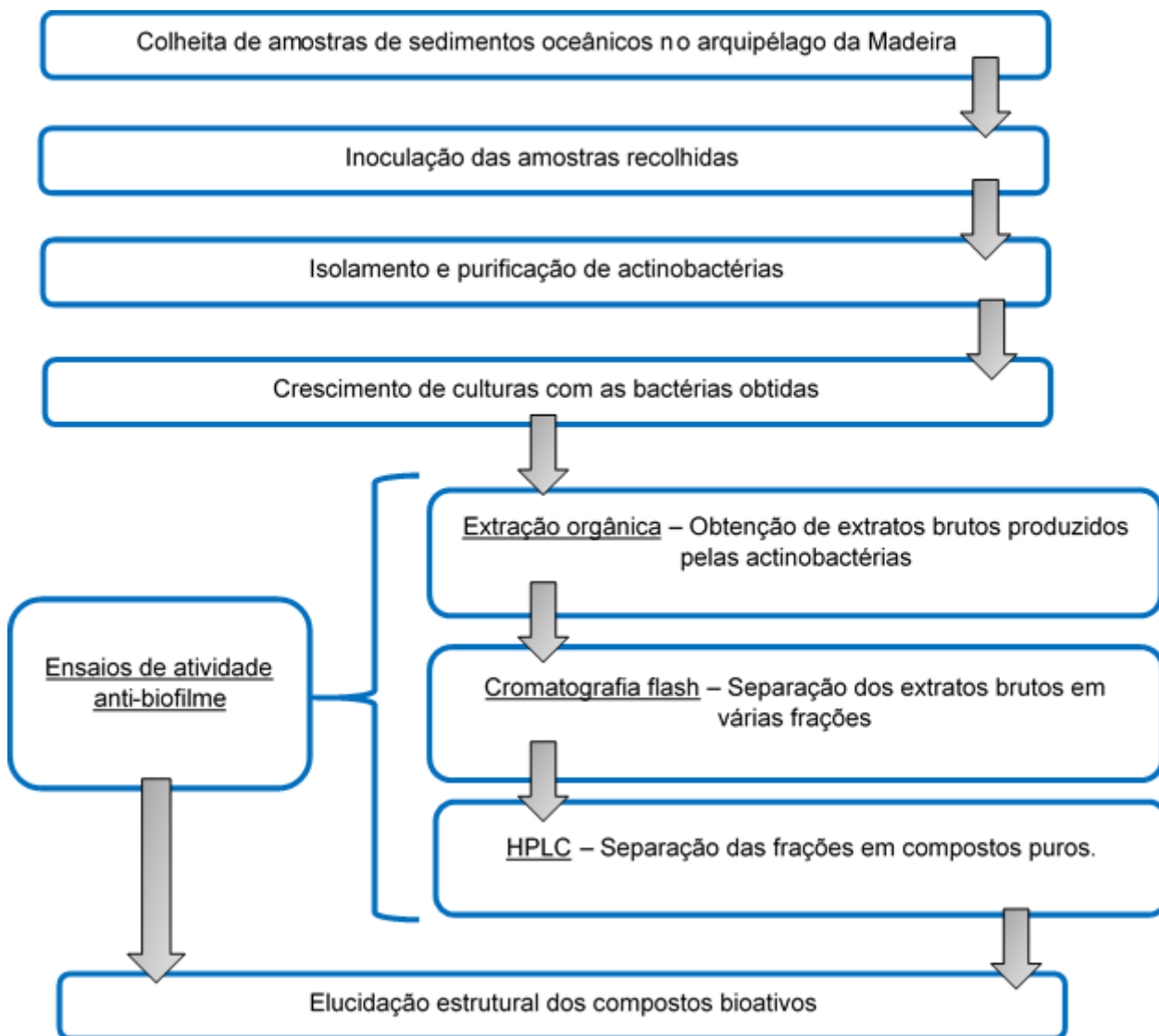


Figura 2.1 - Contextualização do trabalho desenvolvido no âmbito do projeto “Tesouros Oceânicos - Sedimentos oceânicos do arquipélago da Madeira: nova fonte de compostos inovativos e bioativos”

Em Junho de 2012 foram recolhidas 662 amostras de sedimentos oceânicos no arquipélago da Madeira. Estas amostras foram recolhidas à superfície (até 30m) com recurso a mergulho ou em profundidade (até 1300m) com o auxílio de uma draga. Todas as amostras recolhidas foram guardadas em sacos estéreis e conservadas a -20°C. Para análise destas, as amostras foram inoculadas em meios de cultura apropriados.

Posteriormente, procedeu-se à purificação microbiana, tendo sido obtidas 413 estirpes de actinobactérias. Para identificação taxonómica das estirpes bacterianas, procedeu-se à extração de ADN e à sequenciação do gene 16S rRNA.

- Obtenção dos extratos brutos

Para a obtenção dos extratos brutos provenientes das actinobactérias, as culturas foram inoculadas em 50 mL de meio A1 (pré-inóculo) e incubadas com agitação (140 rpm) a 25°C durante 7 dias. Após este período, cerca de 20 ml destas culturas foram inoculadas em 1L de meio A1 fresco e incubadas novamente durante 7 dias. Decorrido este período de tempo, procedeu-se à sua extração orgânica em que 1L de cultura foi colocado numa ampola de decantação onde se adicionou 1L de acetato de etilo (LABCHEM, EUA), evaporando-se o solvente à secura.

- Determinação de atividade antimicrobiana

De modo a avaliar a atividade antibacteriana destes extratos brutos determinou-se da concentração mínima inibitória (MIC), contra duas estirpes bacterianas multi-resistentes de *S. aureus* MRSA COL e *Enterococcus faecium* VRE EF82 (Gill et al., 2005; Mato R. et al., 1996).

- Obtenção das frações

Os extratos brutos foram separados por cromatografia flash (Sílica gel 60 – fase normal, Merck, EUA) em 9 frações, utilizando como gradientes de eluição isoctano (Prolabo; 99,5%): AcOEt – 100:0 a 0:100 – seguido de MeOH:AcOEt – 10:90, 50:50 e 100:0.

- Obtenção de compostos puros

Os vários compostos incluídos em cada fração foram depois purificados por HPLC - cromatografia líquida de elevada eficiência (Dionex 3000) utilizando um detetor de diode array, uma coluna de Sílica C₁₈ de fase reversa (100 Å, modelo 5 µ, 250x10.00mm, Phenomenex, EUA) e caudal 1,5 ml/min.

2.3 Trabalho realizado nesta dissertação

2.3.1 Isolamento por HPLC

Para isolar o composto a testar nos ensaios de atividade antimicrobiana, nomeadamente o composto da estirpe PTM-29 relativos à fração F2 (4.9 mg) usaram-se como eluentes acetonitrilo (ACN; Prolabo, 99,9%) e água (Prolabo) com um caudal 1,5 ml/min. Neste caso, utilizou-se um volume de injeção de 200 µL em metanol (Prolabo; 100%), de acordo com as seguintes condições de eluição:

Tabela 2.1 - Condições do HPLC da eluição da amostra PTM-29;F2

PTM-29;F2	
Tempo (min)	%ACN/0,1% TFA
0 - 15	10 -100
15 - 65	100

2.3.2 Ensaios de atividade antimicrobiana

Para determinar o valor de concentração mínima inibitória (MIC) dos compostos puros PTM-29;F2;F29 (ver seção 2.3.1), PTM-29;F4;F39 e PTM-420;F2+F3;F35 (Isolados no âmbito de outras tese de mestrado) e da tetraciclina, foram utilizadas quatro estirpes de *S. aureus* MRSA (WIS, MW2, HDE288 e COL). As estirpes foram inoculadas em meio líquido TSB e incubadas *overnight* com agitação. A DO_{600nm} foi determinada por espectrofotometria e a cultura foi diluída a uma DO_{600nm} inicial de 0.05.

Alíquotas da cultura foram distribuídas pelos poços de uma placa de 96 poços, tal como os compostos puros e a tetraciclina. Foram também realizados controlos com meio de cultura TSB, meio de cultura TSB inoculado com a estirpe de *S. aureus* em estudo, meio de cultura TSB com DMSO (5%) e meio de cultura TSB com etanol (95%).

As diluições dos compostos puros e da tetraciclina testadas foram 62.5, 31.3, 15.6, 7.81, 3.91, 1.95 e 0.98 µg/mL. Depois de preenchida a placa com cultura e com a quantidade de composto puro e de tetraciclina correspondente à primeira concentração a testar, utilizou-se uma micropipeta multicanal para retirar 100 µL dos poços com esta concentração e diluiu-se na fila da concentração seguinte, e assim sucessivamente até terminar todas as concentrações a testar, ressuspensando entre diluições.

A placa foi posteriormente incubada a 37°C durante 24 horas com agitação (120 rpm). Decorrido este tempo os valores de DO_{600nm} foram tratados estatisticamente, recorrendo ao cálculo do desvio-padrão, de modo a calcular o valor da concentração mínima inibitória - MIC.

2.3.3 Estirpes bacterianas de *S. aureus*

Neste estudo, para a realização dos ensaios de atividade biológica foram utilizadas quatro estirpes de *S. aureus*. A estirpe laboratorial utilizada como referência foi a *S. aureus* NCTC 8325, uma estirpe MSSA de origem laboratorial e produtora de biofilme (Novick, 1967). As outras estirpes utilizadas foram *S. aureus* WIS, MW2 (Baba et al., 2002), HDE288 (Sá-Leão, 1999) e COL (Gill et al., 2005), estirpes MRSA de origem clínica.

2.3.4 Ensaios de atividade anti-biofilme

A atividade anti-biofilme foi testada usando diferentes concentrações dos 7 extratos brutos (500, 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 e 0.98 µg/ml) e dos 49 compostos puros (31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 e 0.98 µg/ml). Os extratos brutos e compostos puros foram diluídos em DMSO obtendo-se uma concentração final de 10 mg/mL.

As estirpes de *S. aureus* referidas anteriormente foram inoculadas em meio de cultura líquido TSB (Applichem, Alemanha) e incubadas com agitação a 37°C *overnight*. A DO a 600 nm (DO_{600nm}) da cultura foi determinada utilizando um espectrofotômetro de UV/VIS (Ultrospec 3100 Pro, Amersham Biosciences, Inglaterra) e em seguida foi diluída de forma a obter uma DO_{600nm} inicial de 0.005, em TSB + 1% glucose (Biochem, França). A cultura foi colocada em placas estéreis (Nunclon Delta Surface, Thermo Scientific, Dinamarca) de 96 poços (200 µl por poço), tendo de seguida sido adicionados a cada poço volumes correspondentes às diferentes concentrações de extratos brutos ou compostos puros a testar. Para cada concentração foram realizados triplicados, com exceção dos controlos que foram feitos em duplicado devido à gestão do espaço da placa. Foram efectuados três tipos de controlos: meio de cultura TSB (controlo negativo), meio de cultura inoculado com a estirpe de *S. aureus* em estudo (controlo positivo) e meio de cultura inoculado onde se adicionou apenas solvente (DMSO) a uma concentração final de 5%. As placas foram incubadas a 37°C durante 18h sem agitação.

Após incubação, o crescimento bacteriano foi analisado por determinação do valor de absorvância (DO_{600nm}) utilizando um leitor de microplacas (Spectra Max 190, Molecular Devices, Dinamarca). De seguida, o meio de cultura e as células não aderentes foram descartadas e as placas lavadas, em água desionizada, duas vezes. Para fixar o biofilme produzido à superfície do poço, as placas foram incubadas durante 1 hora a 60°C. Para quantificar o biofilme, foi adicionada solução de violeta de cristal (Sigma, EUA) a 0.06% (p/v) e a placa foi incubada à temperatura ambiente durante 10 min. As placas foram novamente lavadas duas vezes em água desionizada para remover o excesso de corante. O biofilme produzido foi ressuscitado em ácido acético a 30% (Biochem, França) e o valor de absorvância (DO_{600nm}) foi determinado. Quando o valor de absorvância excedeu a 2.5 efectuou-se uma diluição de 1:10 da suspensão de biofilme e mediu-se novamente a absorvância.

Os valores de DO registados foram analisados estatisticamente através do cálculo do valor de desvio-padrão que permite obter uma medida do grau de dispersão dos valores em relação ao valor médio de forma a calcular as percentagens de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme.

2.3.5 Técnicas para deposição de polímeros

Soluções de Hidroxipropilcelulose (HPC) e Acetato de celulose (AC) (Aldrich, EUA) a 15% (m/m) incorporando de 30 µg/mL de tetraciclina (Glenthams, Reino Unido). A solução de HPC foi preparada utilizando como solvente etanol (100%). Na preparação da solução de AC os solventes utilizados foram uma mistura de acetona (67%) e dimetilacetamida (33%). Para a deposição destas duas soluções poliméricas, com vista à obtenção de filmes finos sólidos, recorreu-se a duas técnicas distintas, a deposição de filmes por espalhamento e a eletrofiação.

2.3.5.1 Deposição de filmes por espalhamento

Para a produção dos filmes finos maciços utilizou-se um aplicador automático (*Automatic Film Applicator – Braive Instruments*) que possui um braço móvel que avança a uma velocidade controlada. As soluções em estudo foram colocadas no interior de uma régua com uma ranhura com 1 mm de altura e à medida que o braço da máquina avança as soluções são depositadas por espalhamento de forma uniforme sobre parafilm (Pechiney, Chicago). Seguidamente este depósito foi colocado num exsiccador para que todo o solvente seja evaporado. Após a total evaporação do solvente os filmes são retirados do substrato (parafilm), obtendo-se assim os filmes finos sólidos.

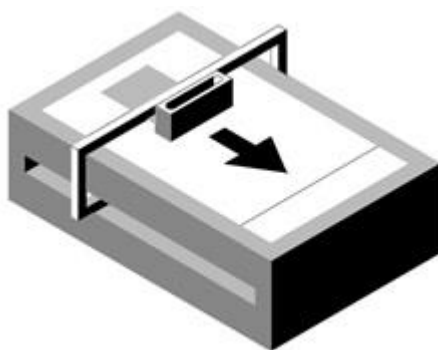


Figura 2.2 – Equipamento utilizado para a produção dos filmes sólidos (Almeida, 2003).

2.3.5.2 Eletrofiação

As diferentes soluções foram colocadas numa seringa de 5 mL, tendo sido usada uma agulha de calibre 23 (B Braun, Alemanha) que foi introduzida na bomba de injeção, responsável por controlar o fluxo da solução de polímero expelido pela seringa. Este sistema era também constituído por um anel condutor mantido de modo coaxial com a ponta da agulha no centro, e eletricamente conectado a este anel como forma de evitar que o jacto se dirigisse no sentido da bomba. A agulha foi ligada diretamente à saída positiva de uma fonte de alta tensão. Após a aplicação do potencial elétrico entre a ponta metálica da agulha e o alvo, a solução polimérica foi continuamente injetada a um caudal constante de 0,20 mL/h e conduzido em direção ao alvo coletor plano, ligado à terra (Figura 1.11). As condições operacionais utilizadas para a deposição contínua das fibras foram uma voltagem de 20 Kv para uma distância entre a ponta da agulha e o coletor de 15 cm.

Após a deposição por estas duas técnicas, discos de 6 mm de diâmetro foram recortados com o auxílio de um punção. Os discos foram mantidos a 4°C.

2.3.6 Ensaios de halos de inibição

As culturas crescidas overnight a 37°C com agitação, das estipes de *S. aureus* a testar foram utilizadas para inocular a superfície de placas de Petri com meio de cultura TSA, utilizando uma zaragatoa estéril. No centro da placa foi colocado um disco de papel impregnado com o composto a testar. Neste trabalho, foram utilizados discos comerciais de tetraciclina (30 µg/ml, Oxoid, Reino Unido) como controlo, discos de HPC e AC obtidos pela técnica da deposição de filmes (ver secção 2.3.5.1) e discos de AC obtidos por electrofiação (ver secção 2.3.5.2), onde a tetraciclina foi incorporada a uma concentração de 30 µg/ml. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 h. Após incubação, registou-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano em redor do disco.

2.3.7 Ensaios de tração

Para a realização dos ensaios mecânicos dos filmes de HPC com tetraciclina foram cortadas várias amostras com as dimensões de 1 × 3 cm². As espessuras dos filmes foram medidas usando um micrómetro digital de resolução 1 µm (Mitutoyo Corp., Japão). Estes ensaios realizaram-se na máquina de ensaios mecânicos de filmes finos *Rheometric Scientific Minimat Firmware 3.1* à temperatura ambiente (25°C). Para a realização dos ensaios de tração, as amostras foram fixadas pelas extremidades nas garras da máquina de tração, sendo a velocidade de avanço de uma garra da máquina de tração em relação à outra de 2 mm/min. Efetuaram-se quatro ensaios de tração e calcularam-se os valores médios dos parâmetros retirados das curvas tensão nominal – extensão nominal (como por exemplo a extensão máxima de fratura e a resistência máxima). Posteriormente, estes valores permitiram calcular o módulo de *Young*.

3. Apresentação e discussão dos resultados

3.1 Avaliação da atividade anti-biofilme contra MRSA de amostras provenientes de actinobactérias

Nesta dissertação foi avaliada a atividade anti-biofilme de diversas amostras, mais especificamente de 7 extratos brutos e de 49 compostos puros, dos quais 11 pertencem à estirpe PTM-346 e 38 à estirpe PTM-420. Os critérios para analisar esta atividade baseiam-se na existência combinada de um valor reduzido de inibição do crescimento bacteriano (inferior ou igual a 40%) e de um valor elevado de inibição de formação de biofilme (superior ou igual a 80%) (Kwasny and Opperman, 2010).

- Atividade anti-biofilme dos extratos brutos:

Como referido anteriormente foi testada a atividade anti-biofilme de 7 extratos brutos, utilizando a estirpe MSSA *S. aureus* NCTC 8325, produtora de biofilme (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Extratos brutos testados nesta dissertação.

Código estirpe / extrato bruto	Caracterização taxonómica
PTM-89	<i>Salinispora pacifica</i>
PTM-98	<i>Salinispora pacifica</i>
PTM-99	<i>Salinispora arenicola</i>
PTM-227	<i>Salinispora pacifica</i>
PTM-305	<i>Salinispora pacifica</i>
PTM-356	<i>Salinispora pacifica</i>
PTM-384	<i>Micromonospora echinospora</i>

Todos os extratos testados apresentaram percentagens de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme fora dos limites pretendidos, embora o extrato da estirpe PTM-384 tenha permitido obter valores de inibição inferiores a 40% para todas as concentrações testadas e valores de inibição de formação de biofilme, próximos de 50%. (Figura 3.1).

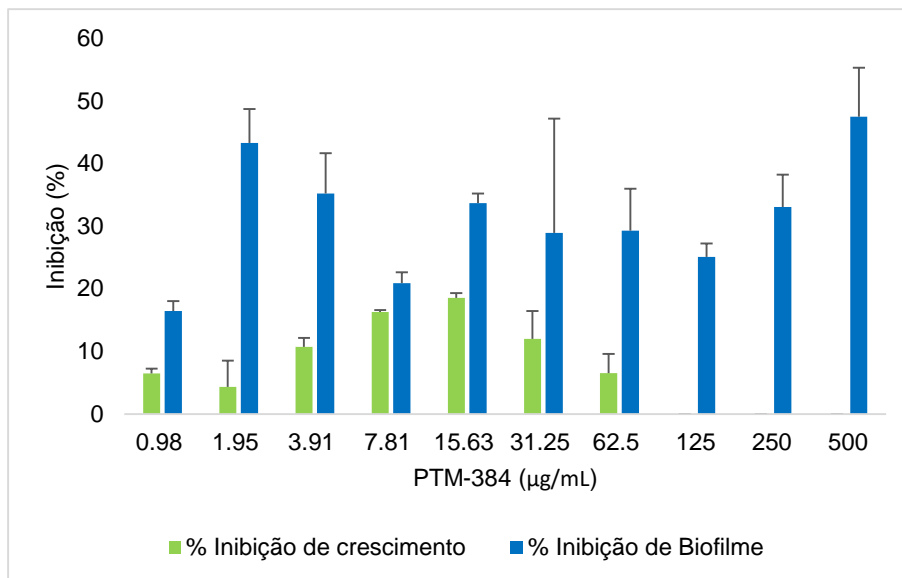


Figura 3.1 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme com os respectivos erros padrão associados a cada concentração do extrato PTM-384 registadas para a estirpe de *S. aureus* NCTC 8325.

- Atividade anti-biofilme dos compostos puros

Numa primeira etapa, os compostos puros foram testados utilizando a estirpe MSSA *S.aureus* NCTC 8325. Os compostos que revelaram resultados promissores foram posteriormente testados contra outras estirpes MRSA *S.aureus* WIS, MW2 e HDE288.

- Atividade anti-biofilme dos compostos puros produzidos pela estirpe PTM-346

Do total de 11 compostos testados da estirpe PTM-346, apenas 5 revelaram resultados promissores (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Compostos puros da estirpe PTM-346 testados nesta dissertação. Destacados a negrito estão assinalados os compostos com resultados promissores.

PTM-346 <i>Streptomyces aculeolatus</i>	Código dos compostos puros
	PTM-346;F8+F9;F24
	PTM-346;F8+F9;F25
	PTM-346;F8+F9;F26
	PTM-346;F8+F9;F27
	PTM-346;F8+F9;F28
	PTM-346;F8+F9;F30
	PTM-346;F8+F9;F33
	PTM-346;F8+F9;F34
	PTM-346;F8+F9;F62
	PTM-346;F8+F9;F63
	PTM-346;F8+F9;F64

Um exemplo de um composto que não revelou resultados significativos foi o composto PTM-346; F8+F9; F25, testado contra a estirpe MSSA *S. aureus* NCTC 8325, como é possível observar no Figura 3.2.

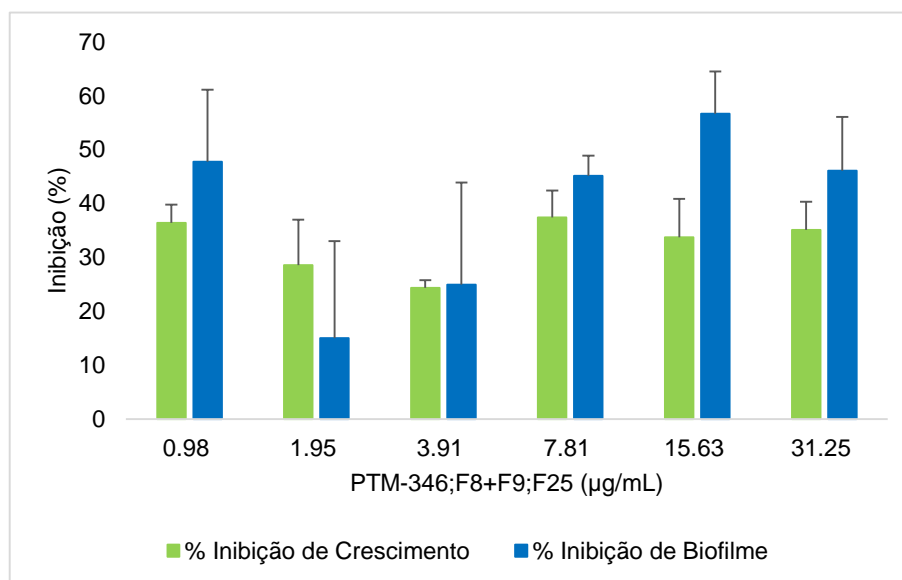


Figura 3.2 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respectivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-346;F8+F9;F25 registadas para a estirpe de *S.aureus* NCTC 8325.

Na Figura 3.2, relativa ao composto PTM-346; F8+F9; F25, os melhores resultados obtidos foram registrados para a concentração de 15.63 µg/mL, onde a inibição de crescimento foi de 33.75% e de inibição de formação de biofilme foi de 56.66%. Assim sendo, como a atividade anti-biofilme se encontra afastada do valor estabelecido de 80%, este não poderá ser considerado um composto promissor.

Nas Tabelas 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 são apresentados os compostos puros com atividade anti-biofilme relativos à estirpe PTM-346 e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme para as estirpes *S. aureus* NCTC, WIS, MW2 e HDE288.

Tabela 3.3 – Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe *S. aureus* NCTC 8325. N.I. – Não inibiu

Estirpe <i>S. aureus</i> NCTC 8325			
Código do composto puro	Concentração (µg/mL)	% Inibição de crescimento	% Inibição de formação de biofilme
PTM-346;F8+F9;F26	31.25	32.98 ± 5.964	63.20 ± 13.170
PTM-346;F8+F9;F34	3.91	28.84 ± 3.653	65.47 ± 0.899
PTM-346;F8+F9;F62	15.63	1.06 ± 26.401	95.47 ± 1.480
PTM-346;F8+F9;F63	15.63	N. I.	59.26 ± 8.752
PTM-346;F8+F9;F64	15.63	N. I.	82.05 ± 0.947

Tabela 3.4 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe *S. aureus* WIS. N.I. – Não inibiu

Estirpe <i>S. aureus</i> WIS			
Código do composto puro	Concentração (µg/mL)	% Inibição de crescimento	% Inibição de formação de biofilme
PTM-346;F8+F9;F26	3.91	N. I.	77.95 ± 3.137
PTM-346;F8+F9;F34	3.91	19.35 ± 5.475	89.15 ± 7.169
PTM-346;F8+F9;F62	31.25	N. I.	76.96 ± 9.958
PTM-346;F8+F9;F63	15.63	N. I.	73.47 ± 12.073
PTM-346;F8+F9;F64	31.25	N. I.	45.86 ± 1.791

Tabela 3.5 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe *S. aureus* MW2.

Estirpe <i>S. aureus</i> MW2			
Código do composto puro	Concentração (µg/mL)	% Inibição de crescimento	% Inibição de formação de biofilme
PTM-346;F8+F9;F63	1.95	2.10 ± 3.146	21.09 ± 2.599

Tabela 3.6 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe *S. aureus* HDE288. N.I. – Não inibiu

Estirpe <i>S. aureus</i> HDE288			
Código do composto puro	Concentração (µg/mL)	% Inibição de crescimento	% Inibição de formação de biofilme
PTM-346;F8+F9;F62	31.25	N. I.	38.47 ± 9.215
PTM-346;F8+F9;F63	31.25	N. I.	25.21 ± 8.544
PTM-346;F8+F9;F64	31.25	13.73 ± 1.749	35.50 ± 4.848

Através da análise das Tabelas 3.3 e 3.4 podemos concluir que os melhores resultados foram registados para a estirpe *S. aureus* NCTC 8325 e para a estirpe MSRA *S. aureus* WIS. Os compostos PTM-346;F8+F9;F34, PTM-346;F8+F9;F62 e PTM-346;F8+F9;F64 revelaram ser os compostos mais promissores, uma vez que apresentaram uma elevada atividade anti-biofilme, sendo esta maior que 80%. Embora tenha sido registada atividade anti-biofilme para as estirpes MRSA *S. aureus* MW2 e HDE288 (Tabelas 3.5 e 3.6), esta não pode ser considerada relevante uma vez que os resultados obtidos se encontram afastados dos valores estabelecidos.

De seguida encontram-se representados nas Figuras 3.3, 3.4 e 3.5, os três compostos que revelaram a atividade anti-biofilme mais elevada sendo estes: PTM-346;F8+F9;F62 e PTM-346;F8+F9;F64 para a estirpe *S. aureus* NCTC 8325 e PTM-346;F8+F9;F34 para a estirpe *S. aureus* WIS. Os restantes gráficos dos compostos que revelaram atividade anti-biofilme podem ser consultado em Anexos I.

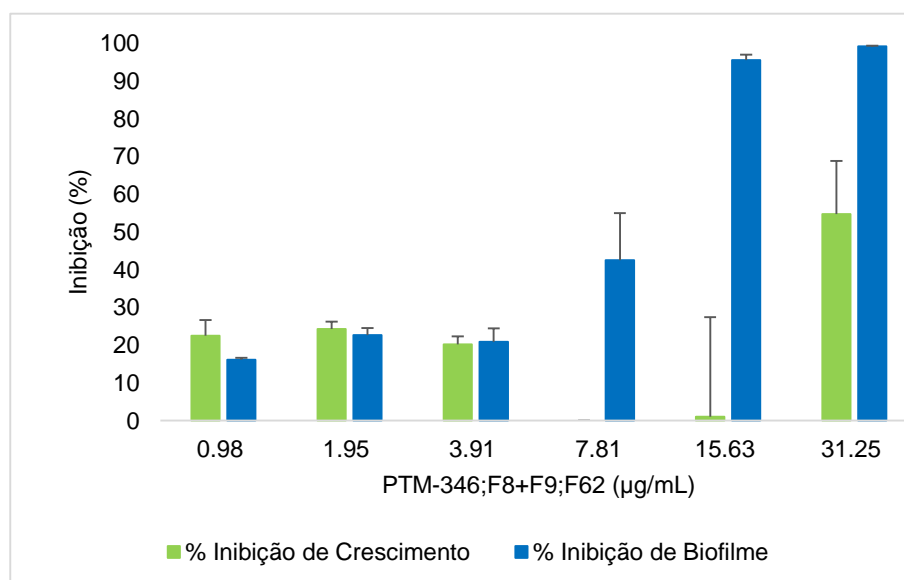


Figura 3.3 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respetivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-346;F8+F9;F62 registadas para a estirpe *S. aureus* NCTC 8325.

Para o composto PTM-346;F8+F9;F62 (Figura 3.3) os resultados mais promissores foram registados para concentração de 15.63 $\mu\text{g/mL}$ (estirpe *S. aureus* NCTC 8325), com uma inibição de crescimento de 1% e uma inibição de formação de biofilme de 95%. A concentração de 31.25 $\mu\text{g/mL}$ registou uma inibição superior de formação de biofilme (99%), mas uma vez que a inibição de crescimento é superior a 40%, esta encontra-se fora dos limites estabelecidos inicialmente.

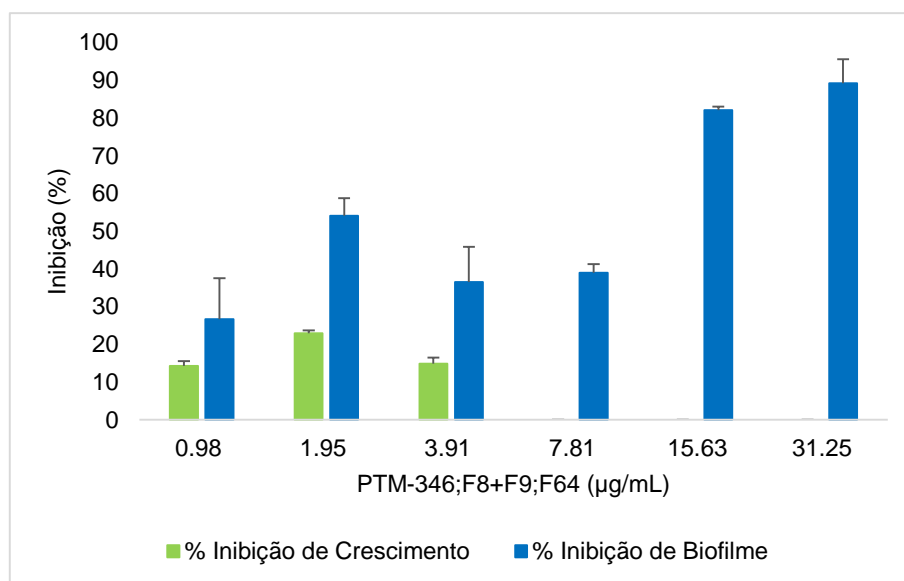


Figura 3.4 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respetivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-346;F8+F9;F64 registadas para a estirpe *S. aureus* NCTC 8325.

Na Figura 3.4, relativa à atividade inibitória do composto PTM-346;F8+F9;F64 contra a estirpe *S. aureus* NCTC 8325, podemos constatar que apesar deste composto apresentar, para a concentração de 31.25 $\mu\text{g/mL}$, uma percentagem de inibição de formação de biofilme de 89%, apresenta uma percentagem de inibição de formação de biofilme idêntica (82%) para a concentração de 15.63 $\mu\text{g/mL}$, indicando que a esta concentração o composto é igualmente eficiente.

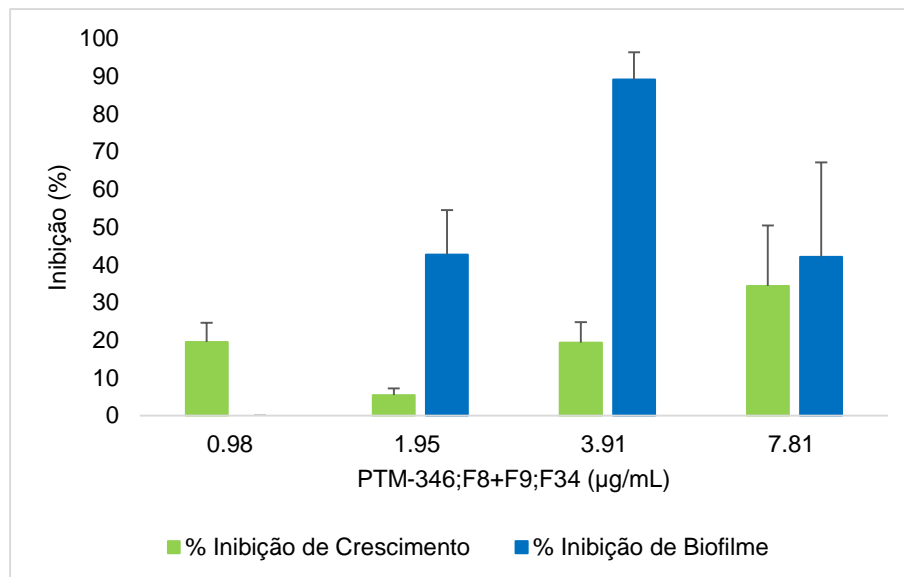


Figura 3.5 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respectivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-346;F8+F9;F34 registadas para a estirpe *S. aureus* WIS.

No caso do composto PTM-346;F8+F9;F34 (Figura 3.5) foram testadas apenas as quatro menores concentrações. Os resultados mais favoráveis foram registados para a concentração de 3.91 µg/mL para a estirpe MRSA *S. aureus* WIS. A inibição de crescimento foi de 19% enquanto a inibição de formação de biofilme foi de 89% que se encontram dentro dos limites estipulados de 40% e de 80%, respetivamente.

- Atividade anti-biofilme dos compostos puros produzidos pela estirpe PTM-420

Foram testados 38 compostos puros produzidos pela estirpe PTM-420, apresentados na tabela seguinte.

Tabela 3.7 - Compostos puros produzidos pela estirpe PTM-420 testados nesta dissertação. Destacados a negrito estão assinalados os compostos com resultados relevantes.

PTM-420 <i>Streptomyces aculeolatus</i>	Compostos Puros
	PTM-420;F5;F8
	PTM-420;F5;F11
	PTM-420;F5;F16
	PTM-420;F5;F20
	PTM-420;F5;F22
	PTM-420;F5;F25
	PTM-420;F5;F31
	PTM-420;F5;F36
	PTM-420;F5;F38
	PTM-420;F5;F42
	PTM-420;F5;F43
	PTM-420;F5;F44
	PTM-420;F5;F45
	PTM-420;F5;F47
	PTM-420;F5;F49
	PTM-420;F5;F57
	PTM-420;F6;F11
	PTM-420;F6;F15
	PTM-420;F6;F17
	PTM-420;F6;F33
	PTM-420;F6;F44
	PTM-420;F7;F5
	PTM-420;F7;F11
	PTM-420;F7;F12
	PTM-420;F7;F14
	PTM-420;F7;F16
	PTM-420;F7;F18
	PTM-420;F7;F21
	PTM-420;F7;F24
	PTM-420;F7;F27
	PTM-420;F7;F29
	PTM-420;F7;F34
	PTM-420;F7;F37
	PTM-420;F7;F39
	PTM-420;F8+F9;F9
	PTM-420;F8+F9;F20
	PTM-420;F8+F9;F22
	PTM-420;F8+F9;F29

Nas Tabelas 3.8, 3.9, 3.10 e 3.11 são apresentados os compostos puros com atividade anti-biofilme relativos à estirpe PTM-420 e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme para as estirpes *S. aureus* NCTC, WIS, MW2 e HDE288.

Tabela 3.8 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe *S. aureus* NCTC 8325.

Estirpe <i>S. aureus</i> NCTC 8325			
Código do composto puro	Concentração (µg/mL)	% Inibição de crescimento	% Inibição de formação de biofilme
PTM-420;F5;F31	1.95	20.62 ± 9.934	80.07 ± 0.724
PTM-420;F5;F38	0.98	28.37 ± 1.919	70.75 ± 1.169
PTM-420;F5;F42	1.95	10.67 ± 2.105	80.45 ± 0.890
PTM-420;F5;F43	7.81	24.35 ± 1.082	64.90 ± 4.439
PTM-420;F5;F45	7.81	28.75 ± 7.587	47.22 ± 3.994
PTM-420;F5;F47	7.81	31.81 ± 8.198	63.31 ± 6.662

Tabela 3.9 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe *S. aureus* WIS.

Estirpe <i>S. aureus</i> WIS			
Código do composto puro	Concentração (µg/mL)	% Inibição de crescimento	% Inibição de formação de biofilme
PTM-420;F5;F31	1.95	11.53 ± 6.370	35.50 ± 9.169
PTM-420;F5;F38	7.81	18.43 ± 1.938	43.16 ± 11.647
PTM-420;F5;F42	15.63	16.51 ± 0.846	58.83 ± 3.389
PTM-420;F5;F43	7.81	27.99 ± 6.050	59.12 ± 23.241
PTM-420;F5;F45	15.63	30.10 ± 3.620	62.46 ± 8.114
PTM-420;F5;F47	0.98	24.41 ± 3.881	48.86 ± 8.550

Tabela 3.10 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe *S. aureus* MW2.

Estirpe <i>S. aureus</i> MW2			
Código do composto puro	Concentração (µg/mL)	% Inibição de crescimento	% Inibição de formação de biofilme
PTM-420;F5;F38	3.91	6.61 ± 2.837	15.55 ± 6.365
PTM-420;F5;F42	15.63	8.56 ± 2.879	17.77 ± 15.602
PTM-420;F5;F47	0.98	17.35 ± 3.506	43.55 ± 2.067

Tabela 3.11 - Compostos puros com atividade anti-biofilme e respectivas concentrações e percentagens de inibição de crescimento e da formação de biofilme para a estirpe *S. aureus* HDE288.

Estirpe <i>S. aureus</i> HDE288			
Código do composto puro	Concentração (µg/mL)	% Inibição de crescimento	% Inibição de formação de biofilme
PTM-420;F5;F38	15.63	39.19 ± 1.515	52.19 ± 4.776
PTM-420;F5;F42	15.63	7.50 ± 0.661	19.11 ± 19.516

Através das Tabelas 3.8 e 3.9 é possível verificar que, mais uma vez, as estirpes MSSA *S. aureus* NCTC 8325 e MRSA *S. aureus* WIS registraram os melhores resultados de inibição de biofilme. Os compostos PTM-420;F5;F31 e PTM-420;F5;F42 revelaram atividade anti-biofilme mais elevada relativamente a uma menor inibição de crescimento para estas duas estirpes de *S. aureus*. De destacar os compostos PTM-420;F5;F47 e PTM-420;F5;F38, que embora a sua percentagem de inibição de biofilme esteja longe do valor ótimo de 80%, foram os únicos que demonstraram uma maior atividade anti-biofilme contra as estirpes MRSA *S. aureus* MW2 e HDE288, respetivamente.

Em seguida, nas Figuras 3.6, 3.7 e 3.8 estão ilustrados os dois compostos que revelaram a atividade anti-biofilme mais elevada sendo estes: PTM-420;F5;F31 para a estirpe *S. aureus* NCTC 8325 e PTM-420;F5;F42 para a estirpe *S. aureus* NCTC e WIS. Os restantes gráficos que revelaram atividade anti-biofilme podem ser consultados em Anexos II.

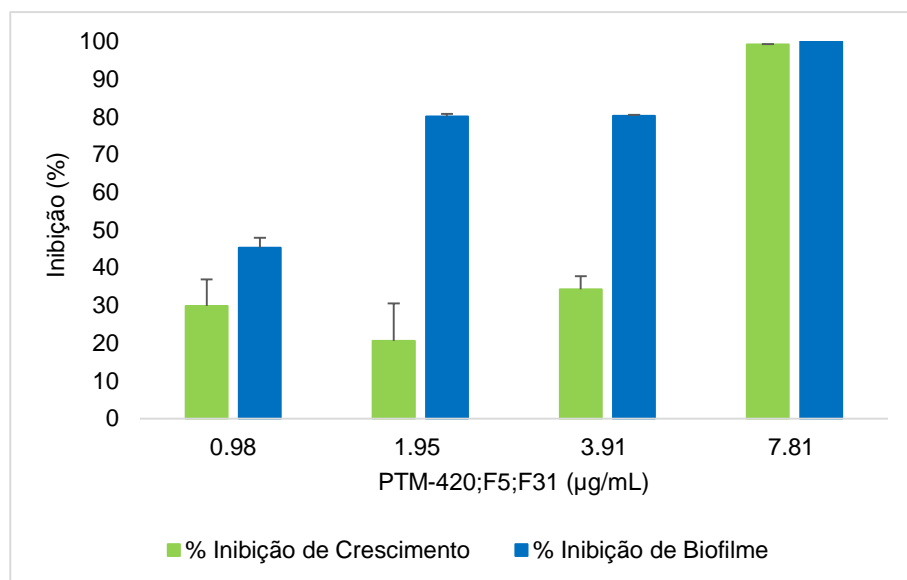


Figura 3.6 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respetivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-420;F5;F31 registadas para a estirpe *S. aureus* NCTC 8325.

Na Figura 3.6 é possível verificar que o composto PTM-420;F5;F31, para a estirpe *S. aureus* NCTC 8325, apresenta percentagens de inibição de formação de biofilme idênticas para as concentrações 3.91 µg/mL e 1.95 µg/mL. Dado que a concentração de 1.95 µg/mL apresenta valores de inibição de crescimento menores do que a concentração de 3.91 µg/mL, a concentração de 1.95 µg/mL é a mais indicada para aplicação. Para a concentração de 7.81 µg/mL foi obtida uma elevada percentagem de inibição de formação de biofilme, mas como foi obtida igual percentagem de inibição de crescimento, estes resultados não podem ser considerados relevantes quanto à inibição de formação de biofilme.

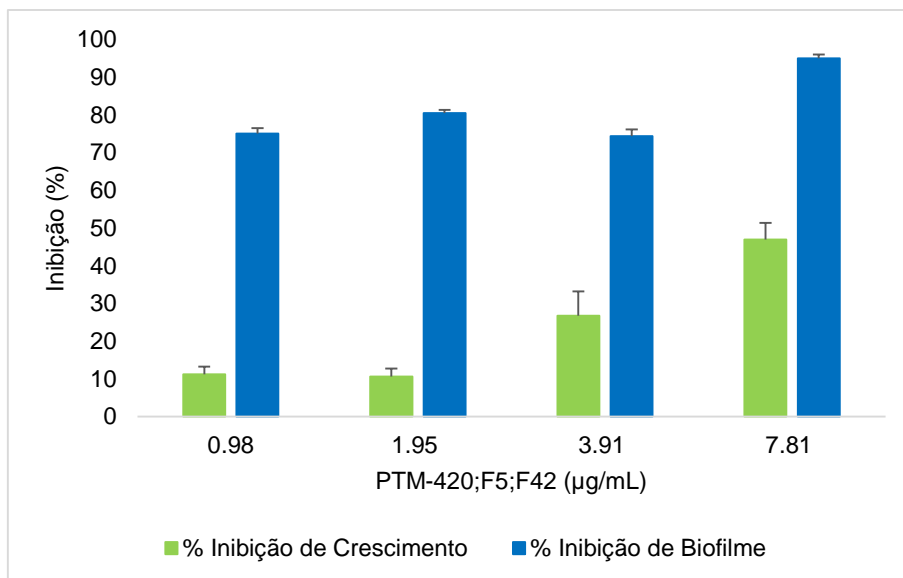


Figura 3.7 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respetivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-420;F5;F42 registadas para a estirpe *S. aureus* NCTC 8325.

Na Figura 3.7 é possível verificar que o composto PTM-420;F5;F42 registou uma atividade anti-biofilme elevada, para a estirpe *S. aureus* NCTC 8325, a uma concentração de 1.95 µg/mL. Os valores obtidos encontram-se dentro da gama de percentagens de inibição de crescimento (40%) e de biofilme (80%) esperadas, sendo estas de 11% e de 80%, respetivamente.

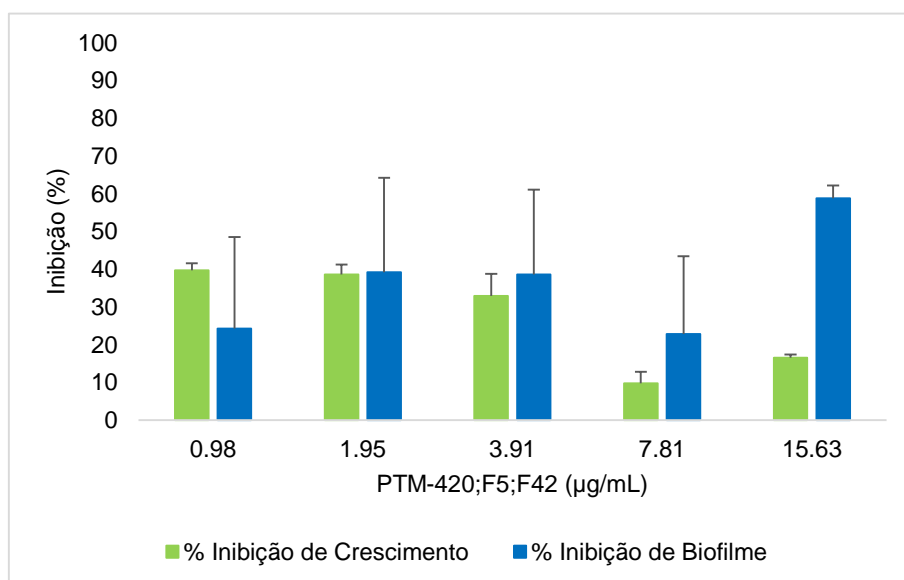


Figura 3.8 - Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme e respetivos erros padrão associados a cada concentração do composto PTM-420;F5;F42 registadas para a estirpe *S. aureus* WIS.

Na Figura 3.8, é possível verificar que o valor mais elevado de inibição de formação de biofilme, para o composto PTM-420;F5,F42 (estirpe *S. aureus* WIS), foi obtido para a concentração 15.63 µg/mL. Embora a inibição da formação de biofilme seja apenas de 59%, este foi o composto que registou a atividade anti-biofilme mais relevante em comparação com a sua percentagem de inibição de crescimento de 16%.

3.2 Desenvolvimento de um compósito polimérico com atividade antimicrobiana

3.2.1 Compósito polimérico com a tetraciclina como composto modelo

Testes preliminares para testar o comportamento de dois polímeros, a hidroxipropilcelulose (HPC) solúvel em água e o acetato de celulose (AC) insolúvel em água foram realizados utilizando a tetraciclina como composto antimicrobiano modelo. Para tal as soluções poliméricas foram depositadas através de filmes finos sólidos ou recorrendo à técnica de electrospinning.

Inicialmente foram realizados ensaios de halos de inibição com discos de HPC (hidroxipropilcelulose) e AC (acetato de celulose) obtidos através de filmes finos sólidos (Figuras 3.9 e 3.10).

- HPC – Hidroxipropilcelulose (Solúvel em água):

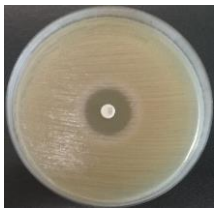
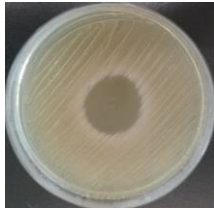
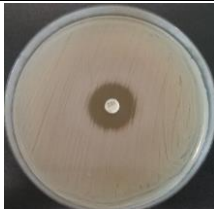
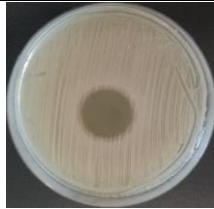

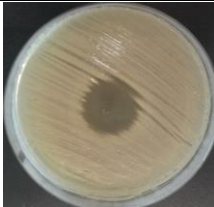
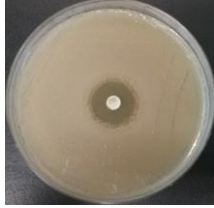
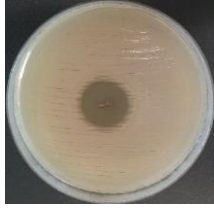
<i>S. aureus</i>	Tetraciclina em discos de papel	Tetraciclina em discos de HPC
NCTC 8325		
	Halo de inibição de 21 mm	Halo de inibição de 25 mm
WIS		
	Halo de inibição de 18 mm	Halo de inibição de 21 mm
MW2		
	Halo de inibição de 20 mm	Halo de inibição de 22 mm
HDE288		
	Halo de inibição de 18 mm	Halo de inibição de 21 mm

Figura 3.9 - Halos de inibição obtidos, para as estirpes de *S. aureus* NCTC 8325, WIS, MW2 e HDE288, com discos comerciais de tetraciclina (30 µg/mL) e com discos de HPC com tetraciclina (30 µg/mL) provenientes de filmes finos sólidos.

Para os halos de inibição com discos de HPC registaram-se diâmetros entre 21 e 25 mm, superiores aos valores obtidos para os halos de inibição com discos comerciais de tetraciclina, que resultaram em halos de 18 a 21 mm (Figura 3.9).

- AC – Acetato de celulose (Insolúvel em água):

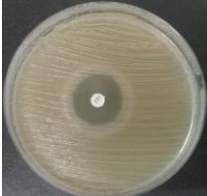

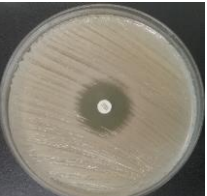
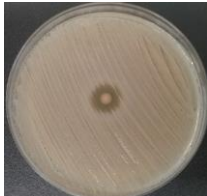


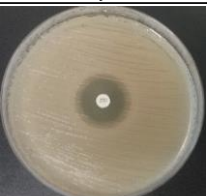

<i>S.aureus</i>	Tetraciclina em discos de papel	Tetraciclina em discos de AC
NCTC 8325		
	Halo de inibição de 23 mm	Halo de inibição de 12 mm
WIS		
	Halo de inibição de 22 mm	Halo de inibição de 14 mm
MW2		
	Halo de inibição de 20 mm	Halo de inibição de 14 mm
HDE288		
	Halo de inibição de 20 mm	Halo de inibição de 14 mm

Figura 3.10 - Halos de inibição obtidos para as estirpes de *S. aureus* NCTC 8325, WIS, MW2 e HDE288, com discos comerciais de tetraciclina (30 µg/mL) e com discos de AC com tetraciclina (30 µg/mL) provenientes de filmes finos sólidos.

Os discos de AC resultaram em halos de inibição com diâmetros entre 12 e 14 mm (Figura 3.10), inferiores aos obtidos para os halos com os discos comerciais de tetraciclina (~20 a 23 mm). Tal resultado pode dever-se ao fato de o polímero AC ser insolúvel em água, não permitindo que o composto antimicrobiano se liberte e difunda no meio de cultura, levando a que o halo de inibição resultante seja da ação inibitória do composto contido à superfície e não em todo o volume do disco.

Posteriormente, para contornar esta limitação, optou-se por depositar o polímero AC recorrendo à técnica de electrofiação, onde a deposição através de fibras permite aumentar a área superficial do disco, e portanto a área de contacto do disco com meio de cultura, de forma a promover a difusão do composto antimicrobiano (Figuras 3.11, 3.12 e 3.13).

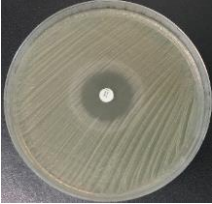
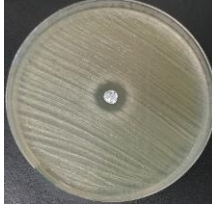
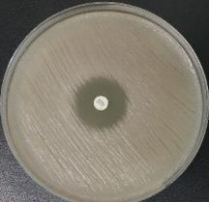
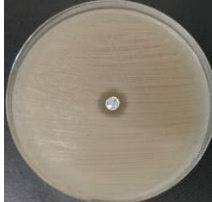
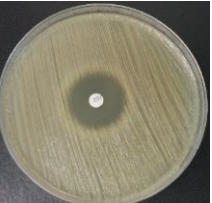
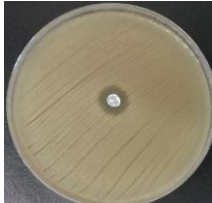
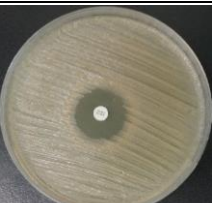

<i>S.aureus</i>	Tetraciclina em discos de papel	Tetraciclina em discos de AC
NCTC 8325		
	Halo de inibição de 22 mm	Halo de inibição de 13 mm
WIS		
	Halo de inibição de 23 mm	Halo de inibição de 11 mm
MW2		
	Halo de inibição de 24 mm	Halo de inibição de 11 mm
HDE288		
	Halo de inibição de 22 mm	Halo de inibição de 14 mm

Figura 3.11 – Halos de inibição obtidos, para as estirpes de *S. aureus* NCTC 8325, WIS, MW2 e HDE288, com discos comerciais de tetraciclina (30 µg/mL) e com discos de AC com tetraciclina (30 µg/mL) provenientes da técnica de electrofiação (deposição de 1 dia).

Na Figura 3.11, onde encontram-se representados os halos de inibição para a deposição de fibras durante um dia, verifica-se que os halos obtidos permanecem com valores semelhantes aos dos discos de AC obtidos pela técnica de filmes finos sólidos. Assim, a deposição de electrofiação de um dia não apresentou qualquer melhoria aos resultados obtidos.

No entanto, os discos obtidos por electrofiação durante um dia levou à obtenção de discos extremamente finos, indicando o pouco tempo de deposição. Apesar de a tetraciclina estar mais acessível na superfície das fibras, existe em menor quantidade para mesma área do que nos discos de filme sólido.

De modo a melhorar estes resultados, foi realizada deposição por electrofiação durante três dias consecutivos.

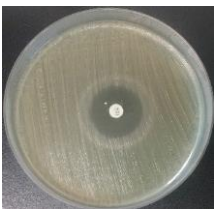
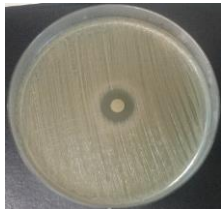


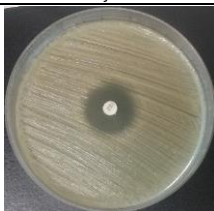
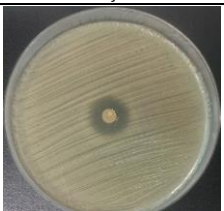
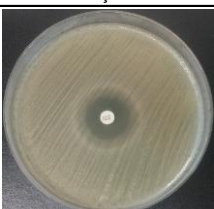
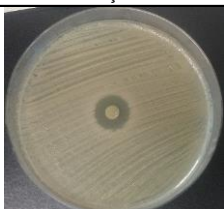
<i>S.aureus</i>	Tetraciclina em discos de papel	Tetraciclina em discos de AC
NCTC 8325		
	Halo de inibição de 24 mm	Halo de inibição de 15 mm
WIS		
	Halo de inibição de 21 mm	Halo de inibição de 13 mm
MW2		
	Halo de inibição de 21 mm	Halo de inibição de 15 mm
HDE288		
	Halo de inibição de 20 mm	Halo de inibição de 15 mm

Figura 3.12 – Halos de inibição obtidos, para as estirpes de *S. aureus* NCTC 8325, WIS, MW2 e HDE288, com discos comerciais de tetraciclina (30 µg/mL) e com discos de AC com tetraciclina (30 µg/mL) provenientes da técnica de electrofiação (deposição de 3 dias).

Os halos de inibição registados foram superiores aos halos obtidos para os discos com a deposição de apenas um dia, com halos entre 13 e 15mm (Figura 3.12), representando um aumento percentual de aproximadamente 16%.

Como os resultados obtidos para os halos de inibição ainda eram inferiores aos halos para a tetraciclina comercial, realizou-se novamente deposição por electrofiação durante três dias seguidos, mas com o triplo da quantidade de tetraciclina em relação à quantidade de polímero.

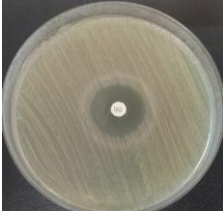
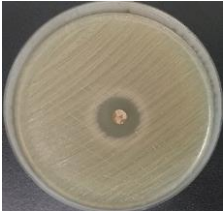
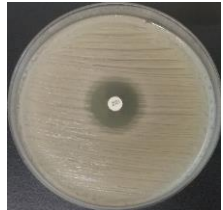


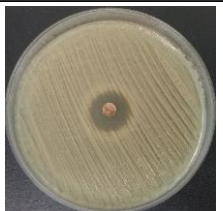
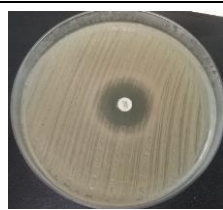
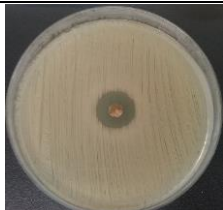
<i>S.aureus</i>	Tetraciclina em discos de papel	Tetraciclina em discos de AC
NCTC 8325		
	Halo de inibição de 22 mm	Halo de inibição de 19 mm
WIS		
	Halo de inibição de 20 mm	Halo de inibição de 16 mm
MW2		
	Halo de inibição de 21 mm	Halo de inibição de 16 mm
HDE288		
	Halo de inibição de 20 mm	Halo de inibição de 17 mm

Figura 3.13 – Halos de inibição obtidos, para as estirpes de *S. aureus* NCTC 8325, WIS, MW2 e HDE288, com discos comerciais de tetraciclina (30 µg/mL) e com discos de AC com tetraciclina (90 µg/mL) provenientes da técnica de electrofiação (deposição de 3 dias e solução com o triplo da quantidade de tetraciclina).

Foram obtidos halos de inibição entre 16 e 19 mm (Figura 3.13). Embora os resultados dos halos de inibição não sejam iguais aos dos discos comerciais de tetraciclina, são significativamente melhores (15%) do que os dos ensaios anteriores com discos de deposição de electrofiação de três dias. Portanto, a utilização de polímeros insolúveis demonstra que as moléculas do princípio ativo estão dispersas em volume e apenas as áreas superficiais estão a exercer a sua função.

Deste modo, foi selecionado o polímero HPC para a continuação do trabalho em que se pretendia a incorporação dos produtos naturais marinhos. Este polímero é solúvel em água, o que permite que a totalidade do composto incorporado no disco exerça a sua atividade sendo mais adequado ao resultado final pretendido, um penso, que não tenha de ser necessidade de ser removido.

3.2.2 Atividade antimicrobiana de três compostos produzidos por actinobactérias

Com o intuito de determinar a quantidade de produtos naturais marinhos a adicionar à solução polimérica, três compostos puros, dois pertencentes à estirpe PTM-29 e um da estirpe PTM-420 (Tabela 3.12) foram avaliados em ensaios antimicrobianos.

Estudos prévios já tinham evidenciado a atividade antimicrobiana destes compostos marinhos contra a estirpe MRSA COL. Neste caso pretendemos testar esta atividade utilizando as estirpes e as condições de crescimento utilizadas neste trabalho.

Estes ensaios tinham como objetivo comparar a atividade antimicrobiana e o valor de MIC (concentração mínima inibitória) da tetraciclina, utilizada neste estudo como composto modelo, permitindo comparar a sua MIC com dos compostos puros em estudo pertencentes a estirpes da espécie *Streptomyces aculeolatus*.

Tabela 3.12 – Compostos puros testados nos ensaios de atividade antimicrobiana.

Compostos puros
PTM-29;F2;F29
PTM-29;F4;F39
PTM-420;F2+F3;F35

Na Tabela 3.13 estão apresentados os resultados da MIC obtida para cada composto e para as estirpes *S. aureus* WIS, MW2, HDE288 e COL em estudo e subsequentemente os gráficos correspondentes (Figuras 3.14, 3.15, 3.16 e 3.17).

Tabela 3.13 - Concentração mínima inibitória (MIC), para as estirpes de *S.aureus* WIS, MW2, HDE288 e COL, obtida para os compostos puros PTM-29; F2; F29, PTM-29; F4, F39, PTM-420; F2+F3; F35 e para a tetraciclina. N.I. – Não inibiu

Compostos em estudo	MIC (µg/mL)			
	<i>S. aureus</i> WIS	<i>S. aureus</i> MW2	<i>S. aureus</i> HDE288	<i>S. aureus</i> COL
PTM-29;F2;F29	15.63	15.63	31.25	15.63
PTM-29;F4;F39	15.63	15.63	15.63	15.63
PTM-420;F2+F3;F35	7.81	7.81	7.81	7.81
Tetraciclina	1.95	1.95	7.81	N.I.

Na Tabela 3.13, verifica-se que o composto PTM-420;F2+F3;F35 apresenta MIC de 7.81 µg/mL, para todas as estirpes de *S.aureus* em estudo, sendo este o composto com uma MIC mais próxima da MCI para a tetraciclina. Os compostos PTM-29;F2;F29 e o PTM-29;F4;F39 apresentam uma MIC mais elevada, para todas as estirpes *S. aureus*, relativamente à MIC obtida para a tetraciclina. A estirpe *S. aureus* COL apresentou resistência à tetraciclina.

- *S. aureus* WIS:

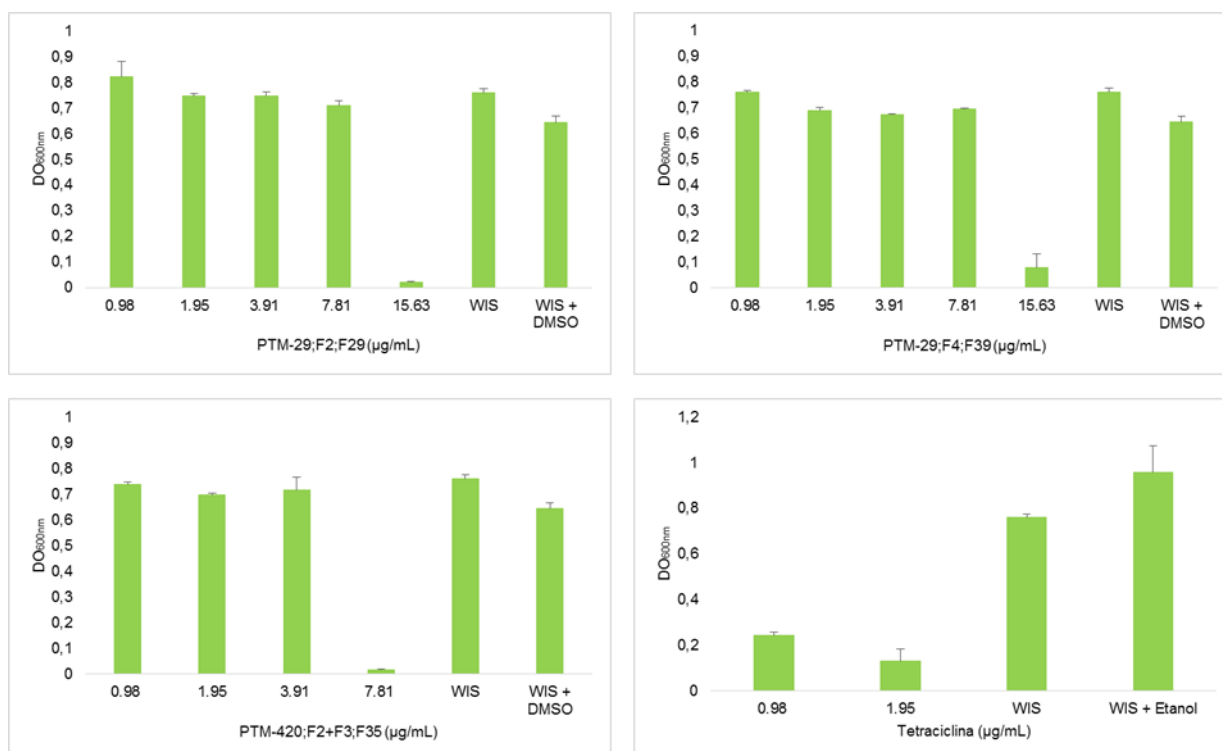


Figura 3.14 - Valor de absorvância (DO_{600nm}) da cultura de *S. aureus* WIS incubada com diferentes concentrações dos compostos puros PTM-29;F2;F29, PTM-29;F4;F39, PTM-420; F2+F3; F35 e Tetraciclina. São representados os valores médios (n=3) e o respetivo erro padrão associados a cada concentração.

Através da análise da Figura 3.14 é possível concluir que os compostos PTM-29;F2;F34 e PTM-29;F4;F39 apresentam um valor de MIC de 15.63 µg/mL enquanto que o composto PTM-420;F2+F3;F35 apresenta um valor de 7.81 µg/mL. O valor de MIC da tetraciclina foi de 1,95 µg/mL.

- *S. aureus* MW2:

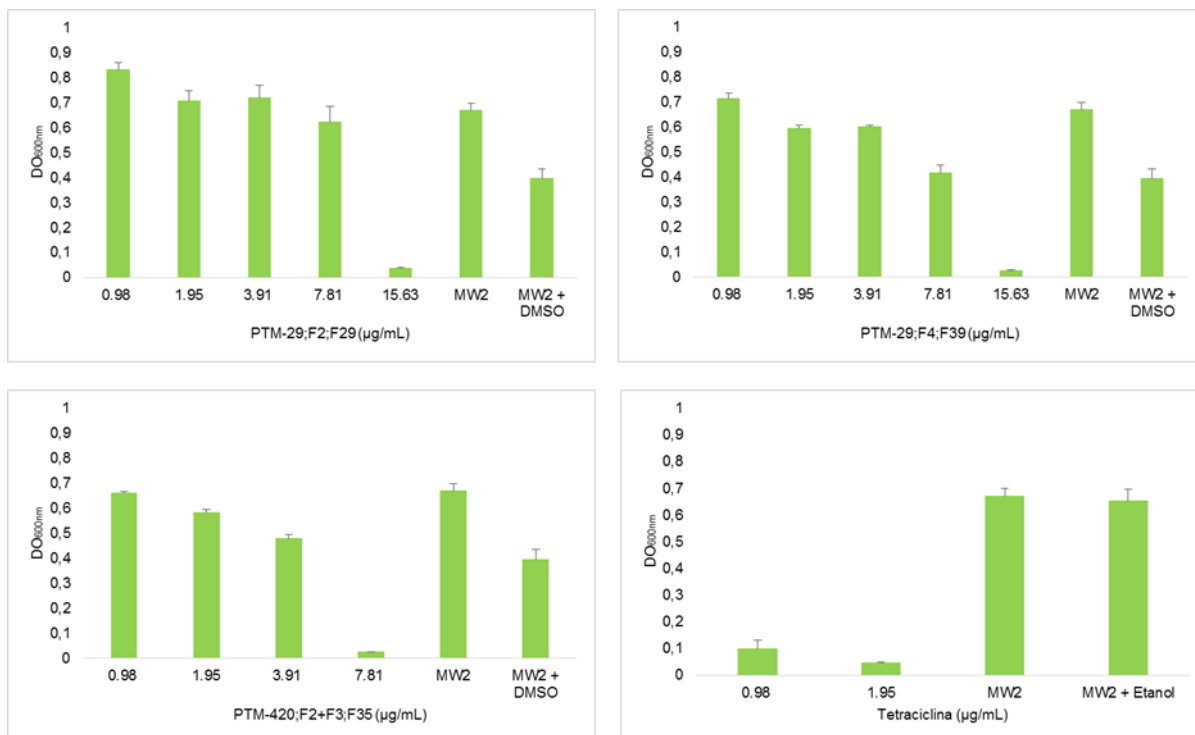


Figura 3.15 - Valor de absorvância (DO_{600nm}) da cultura de *S. aureus* MW2 testada com diferentes concentrações dos compostos puros PTM-29;F2;F29, PTM-29;F4;F39, PTM-420; F2+F3; F35 e Tetraciclina. São representados os valores médios (n=3) e o respectivo erro padrão associado a cada concentração.

A Figura 3.15 mostra que, mais uma vez, os compostos PTM-29;F2;F29 e PTM-29;F4;F39 apresentam um valor de MIC de 15.63 µg/mL. O composto PTM-420;F2+F3;F35 apresentou um valor de MIC de 7.81 µg/mL e a tetraciclina um valor de MIC de 1.95 µg/mL.

- *S. aureus* HDE288:

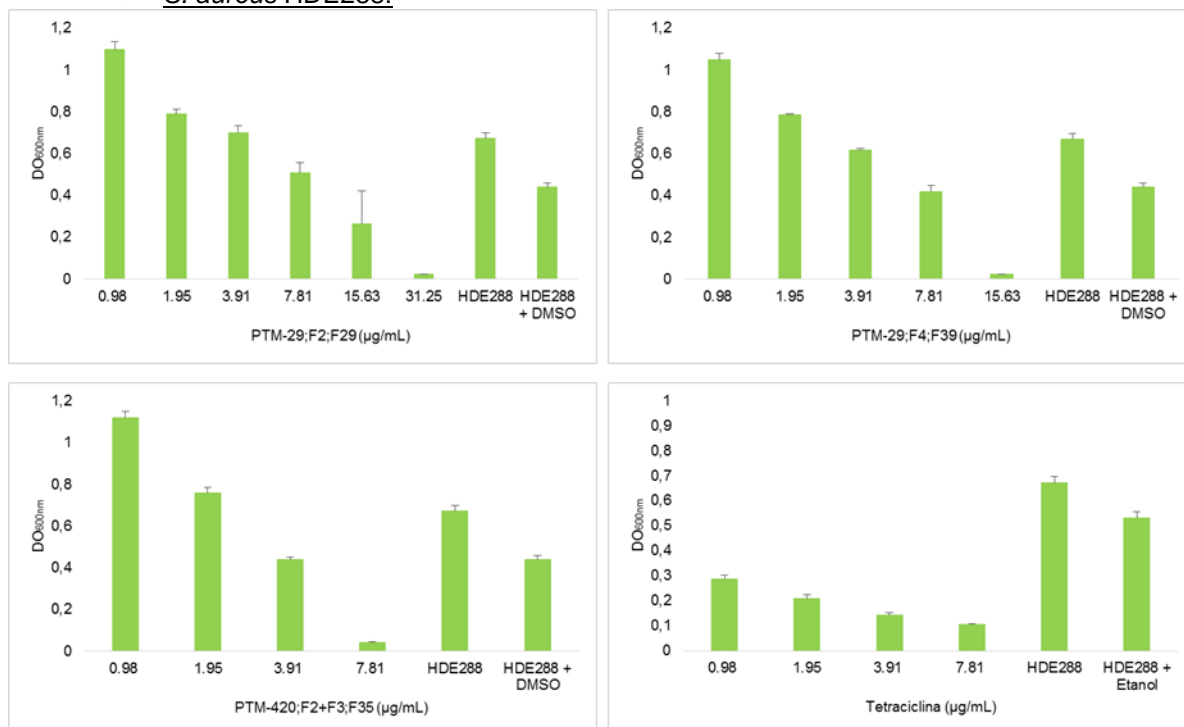


Figura 3.16 - Valor de absorvância (DO_{600nm}) da cultura de *S. aureus* HDE288 testada com diferentes concentrações dos compostos puros PTM-29;F2;F29, PTM-29;F4;F39, PTM-420;F2+F3;F35 e Tetraciclina. São representados os valores médios (n=3) e o respectivo erro padrão associado a cada concentração.

Observa-se que o composto PTM-F29;F2;F29 possui um valor de MIC de 31.25 µg/mL, um valor mais elevado do que para as estirpes referidas anteriormente. Os compostos PTM-29;F4;F39 e PTM-420;F2+F3;F35 apresentaram um valor de MIC foi de 15.63 µg/mL e 7.81 µg/mL, respetivamente. O valor de MIC da tetraciclina foi de 7.81 µg/mL.

- *S. aureus* COL:

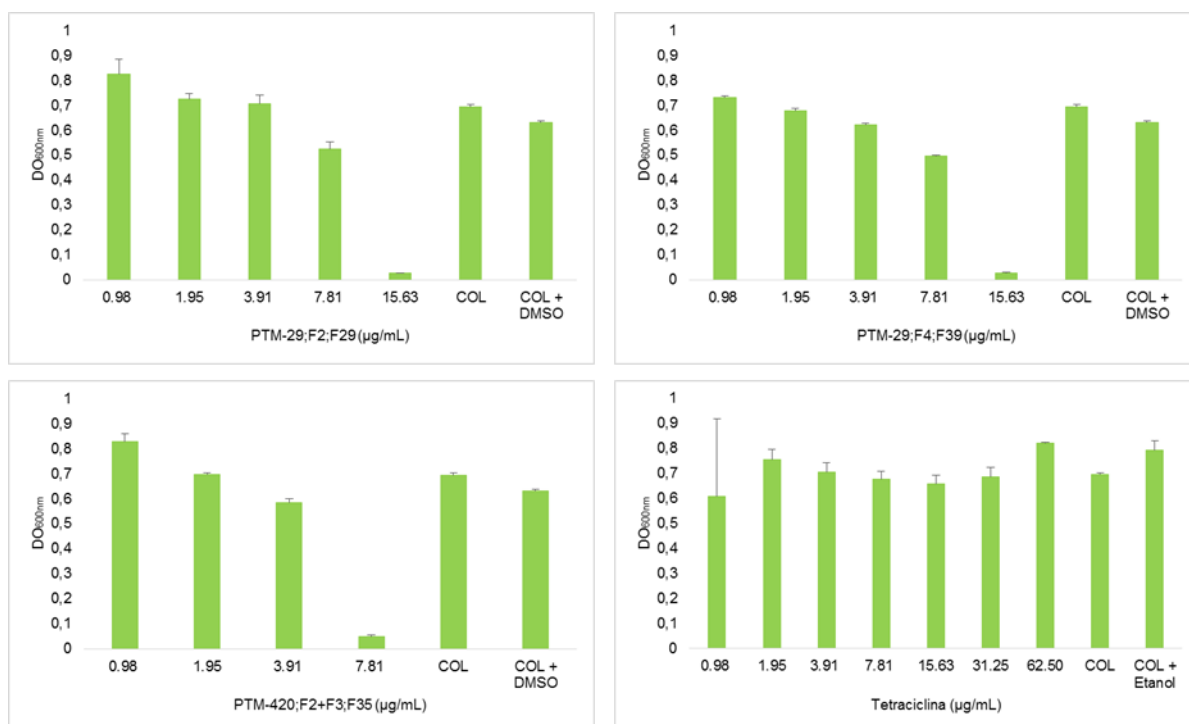


Figura 3.17 - Valor de absorvância (DO_{600nm}) da cultura de *S. aureus* COL testada com diferentes concentrações dos compostos puros PTM-29;F2;F29, PTM-29;F4;F39, PTM-420;F2+F3;F35 e Tetraciclina. São representados os valores médios (n=3) e o respectivo erro padrão associado a cada concentração.

Para a estirpe de *S. aureus* COL, o valor de MIC obtido para os compostos PTM-29;F2;F29 e PTM-29;F4;F39 foi novamente de 15.63 µg/mL enquanto que para o composto PTM-420;F2+F3;F35 o valor de MIC foi 7.81 µg/mL. Mas para a tetraciclina não foi possível estabelecer um valor de MIC, confirmando que esta estirpe de *S. aureus* é intrinsecamente resistente à tetraciclina (Gill et al., 2005).

3.2.3 Compósitos poliméricos de HPC e compostos antimicrobianos provenientes de actinobactérias

- PTM-420;F2+F3;F35:

Inicialmente, foi selecionado o composto puro PTM-420;F2+F3;F35 para o desenvolvimento do compósito polimérico pois este apresentava um valor de concentração mínima inibitória (MIC) mais reduzido (7.81 µg/mL) e mais próximos dos valores de MIC obtidos para a tetraciclina. A solução polimérica foi preparada misturando o polímero HPC e o composto puro PTM-420;F2+F3;F35 para uma concentração de 15% (m/m).

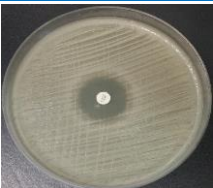
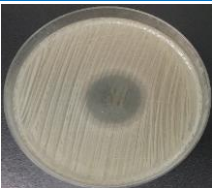


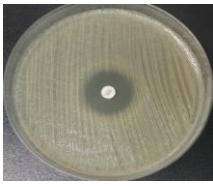
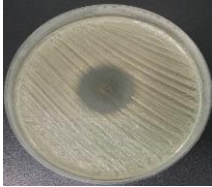
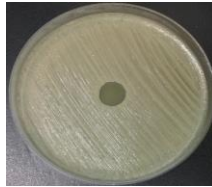
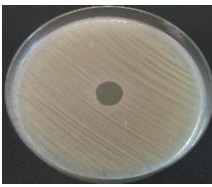
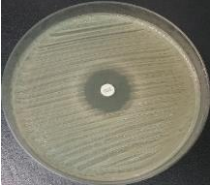
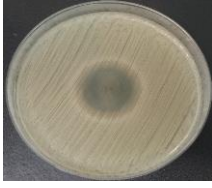
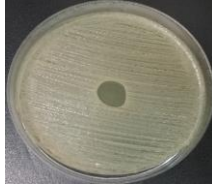
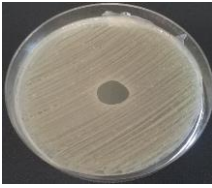



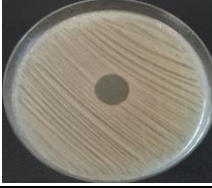
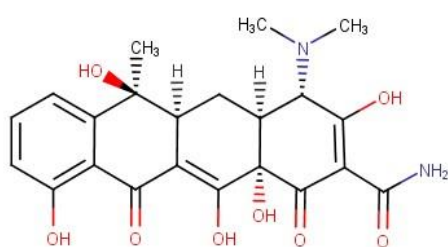
<i>S.aureus</i>	Tetraciclina em discos de papel	Tetraciclina em discos de HPC	PTM-420;F2+F3;F35 em discos de HPC	PTM-420;F2+F3;F35 em discos de HPC (50 dias)
WIS				
	Halo de inibição de 22 mm	Halo de inibição de 25 mm	Halo de inibição de 10 mm	Halo de inibição de 12 mm
MW2				
	Halo de inibição de 21 mm	Halo de inibição de 25 mm	Halo de inibição de 10 mm	Halo de inibição de 13 mm
HDE288				
	Halo de inibição de 22 mm	Halo de inibição de 22 mm	Halo de inibição de 12 mm	Halo de inibição de 13 mm
COL				
	N.I.	Halo de inibição de 8 mm	Halo de inibição de 12 mm	Halo de inibição de 15 mm

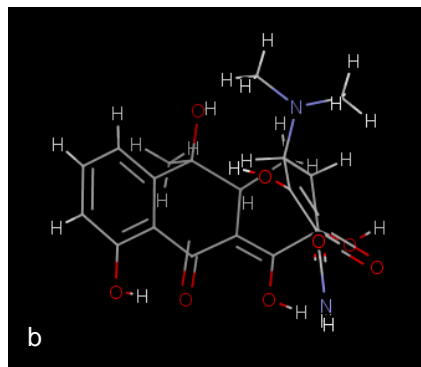
Figura 3.18 – Halos de inibição obtidos, para as estirpes de *S. aureus* WIS, MW2, HDE288 e COL com discos comerciais de tetraciclina (30 µg/mL), discos de HPC com tetraciclina (30 µg/mL) e discos de HPC com o composto puro PTM-420;F2+F3;F35 (Resultados registrados 24 H após os ensaios e 50 dias depois). N.I. – Não inibiu.

Através da análise dos halos de inibição (de 10 a 12 mm) obtidos para este composto (Figura 3.18), verificou-se que estes não são semelhantes aos halos obtidos para os discos comerciais (21-22 mm) de tetraciclina nem aos discos de HPC incorporados com a tetraciclina (~25 mm), o que sugere que o composto não foi libertado do disco de HPC, nem o polímero (solúvel em água) se dissolveu.

De seguida estão representadas as estruturas químicas (2D e 3D) referentes ao composto modelo tetraciclina e aos compostos puros PTM-420;F2+F3;F35 e PTM-29;F4;F39 (isoprenóides híbridos da família das Napiradiomicinas) cuja estrutura foi elucidada no âmbito do projeto “Tesouros Oceânicos -Sedimentos oceânicos do arquipélago da Madeira: nova fonte de compostos inovativos e bioativos”.

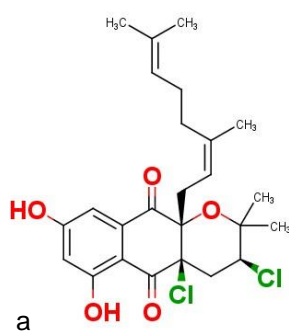


a

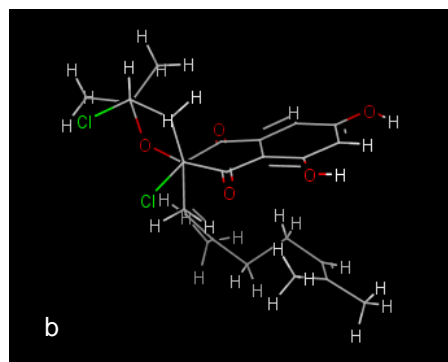


b

Figura 3.19 – Estrutura química da tetraciclina. (a) Estrutura 2D; (b) Estrutura 3D. (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10257122.html> - Consultado a 16-9-16)



a



b

Figura 3.20 – Estrutura química do composto puro PTM-420; F2+F3; F35. (a) Estrutura 2D; (b) Estrutura 3D. (Wu et al., 2013)

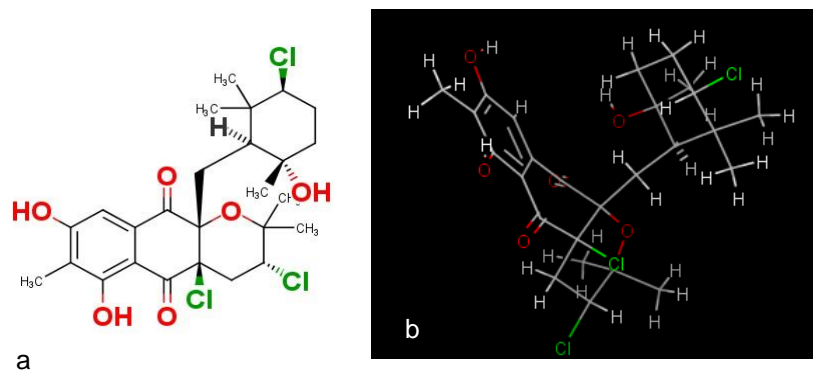


Figura 3.21 – Estrutura química do composto puro PTM-29; F4; F39. (a) Estrutura 2D; (b) Estrutura 3D. (Fukuda, 1989)

Os resultados anteriores (Figura 3.18) poderão ser justificados pelo facto deste composto apresentar uma estrutura química bastante complexa, como podemos ver na Figura 3.20, não apresenta as características planares da tetraciclina Figura 3.19, possui uma cadeia apolar livre, conferindo pouca afinidade para o polímero e possivelmente atribuindo alguma hidrofobicidade que impossibilitou a sua difusão.

Os ensaios de halo de inibição foram repetidos, após 50 dias, utilizando os mesmos discos de HPC com o composto PTM-420;F2+F3;F35. Verificou-se uma ligeira alteração nos halos de inibição, sendo que os seus diâmetros aumentaram provavelmente devido ao facto de o polímero se ter dissolvido (Figura 3.18).

- PTM-29; F4; F39:

Para aumentar a afinidade do composto para o polímero e diminuir a hidrofobicidade, optámos pela incorporação de um outro composto, PTM-29;F4;F39 (Figura 3.21) que possui um ciclohexano com um grupo OH, tornando este composto mais polar do que o anterior e com maior possibilidade de interação (pontes de hidrogénio) com o polímero, com o intuito de que este composto se pudesse difundir mais facilmente do que o anterior.

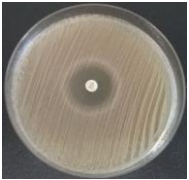
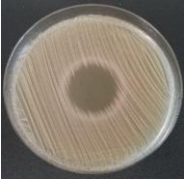
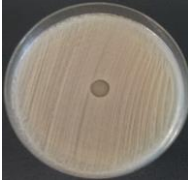
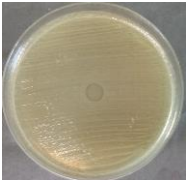
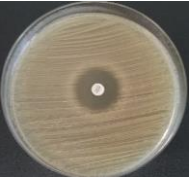
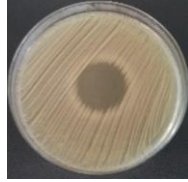
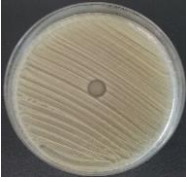
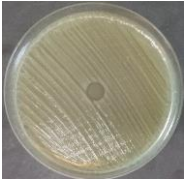
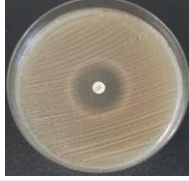
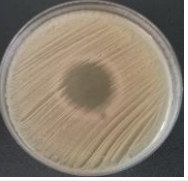
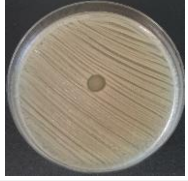
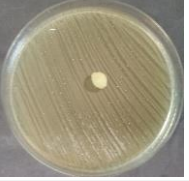
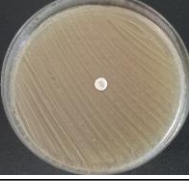


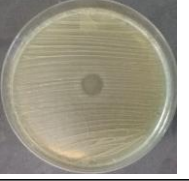
<i>S. aureus</i>	Tetraciclina em discos de papel	Tetraciclina em discos de HPC	PTM-29;F4;F39 em discos de HPC	PTM-29;F4;F39 em discos de HPC (50 dias)
WIS				
	20 mm	25 mm	9 mm	10 mm
MW2				
	20 mm	25 mm	10 mm	10 mm
HDE288				
	21 mm	23 mm	10 mm	10 mm
COL				
	N.I.	9 mm	11 mm	12 mm

Figura 3.22 – Halos de inibição obtidos, para as estirpes de *S. aureus* WIS, MW2, HDE288 e COL com discos comerciais de tetraciclina (30 µg/mL), discos de HPC com tetraciclina (30 µg/mL) e discos de HPC com o composto puro PTM-29;F4;F39 (Resultados registados 24 H após os ensaios e 50 dias depois). N.I. – Não inibiu.

No entanto, não se verificou uma maior difusão do composto PTM-29;F4;F39 como é possível observar pela Figura 3.22, dado que os halos de inibição obtidos apresentam dimensões entre 9 e 11 mm, inferiores aos obtidos para os discos de tetraciclina comerciais (20-21 mm), para os discos de HPC incorporados com tetraciclina (~25 mm) e para os discos com o composto PTM-420;F2+F3;F35 (10-11 mm). Mais uma vez, o composto não se difundiu e o polímero também não se dissolveu. Estes resultados parecem indicar que a afinidade do composto para o polímero é tal que impede a difusão do composto e a dissolução do polímero.

Relativamente ao ensaio com duração de 50 dias, utilizando os discos de HPC com o composto PTM-29;F4;F39, verificou-se um ligeiro aumento dos halos de inibição para as estirpes *S. aureus* WIS e COL.

3.2.4 Análise dos filmes obtidos por AFM (Microscopia de força atômica)

Os filmes finos sólidos obtidos no decorrer deste trabalho foram avaliados através da técnica de AFM – Microscopia de força atômica. Esta técnica de análise permitiu obter imagens da superfície dos filmes, utilizando um sistema de posicionamento que realiza movimentos em três direções (x, y, z).

- Filme de HPC:

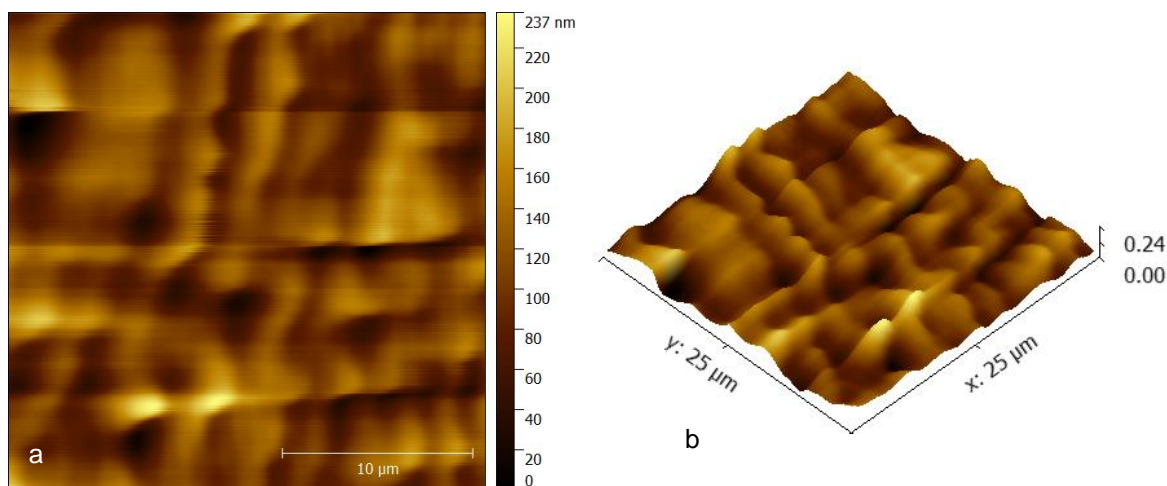


Figura 3.23- AFM obtido para o filme de HPC; (a) Imagem 2D; (b) Imagem 3D.

- Filme de HPC com tetraciclina:

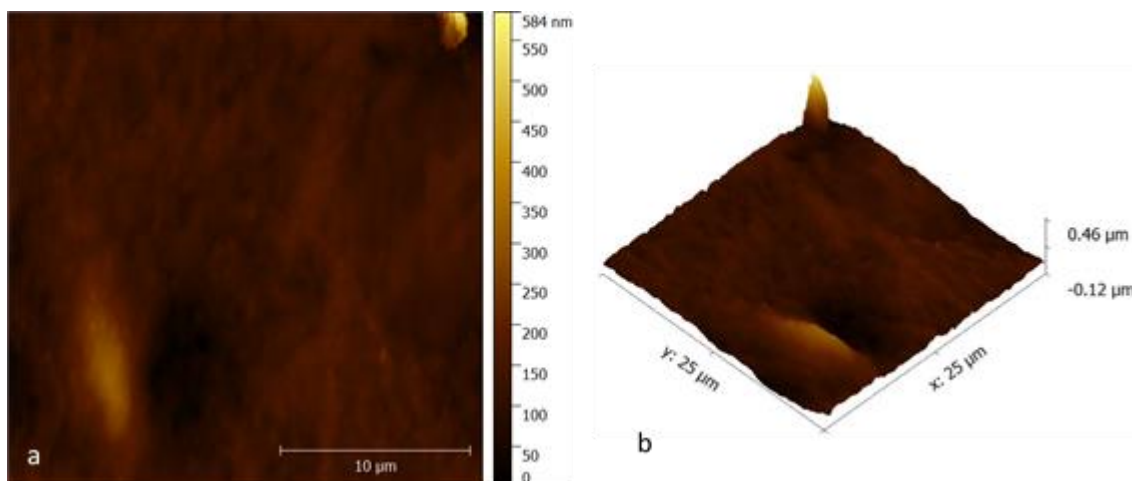


Figura 3.24- AFM obtido para o filme de HPC com incorporação da tetraciclina; (a) Imagem 2D; (b) Imagem 3D.

- Filme de HPC com composto puro PTM-420;F2+F3;F35:

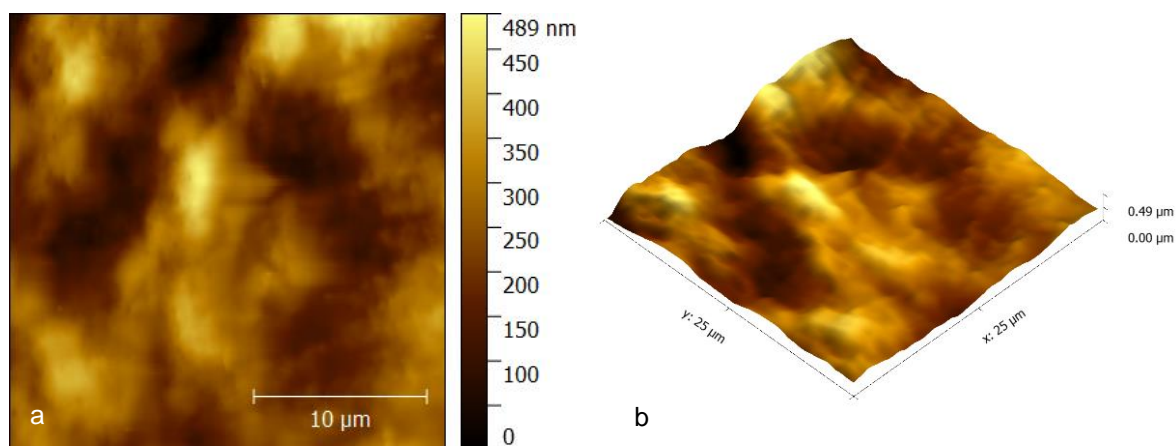


Figura 3.25-AFM obtido para o filme de HPC com incorporação do composto puro PTM-420;F2+F3;F35; (a) Imagem 2D; (b) Imagem 3D.

- Filme de HPC com composto puro PTM-29;F4;F39:

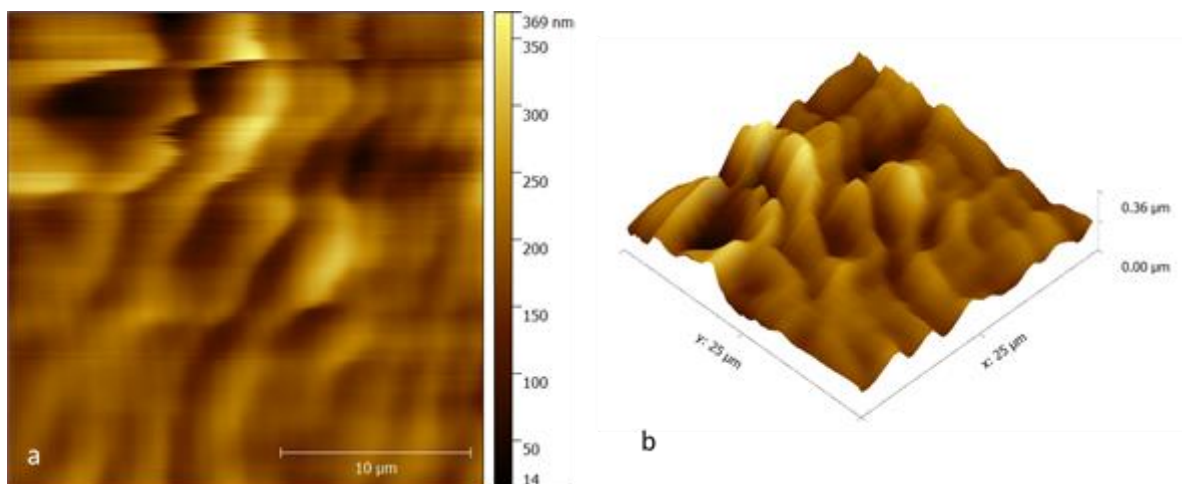


Figura 3.26- AFM obtido para o filme de HPC com incorporação do composto puro PTM-29;F4;F39; (a) Imagem 2D; (b) Imagem 3D.

A Figura 3.23, em que o filme observado contém apenas polímero, serve como base para a análise dos filmes com os diferentes compostos incorporados. Pela observação das imagens 2D e 3D obtidas para os filmes de HPC com os compostos puros PTM-420;F2+F3;F35 (Figura 3.25) e PTM-29;F4;F39 (Figura 3.26) é possível verificar que estas são homogêneas, pouco rugosas e apresentam um aspeto semelhante quer em relação ao filme sem composto, quer entre si.

O filme de HPC com incorporação de tetraciclina (Figura 3.24) apresenta saliências e depressões com maior amplitude (584 nm), demonstrando uma rugosidade superficial ligeiramente diferente do filme de HPC e dos filmes que contêm os produtos naturais marinhos.

3.3.5 Ensaios de tração

As propriedades mecânicas dos filmes finos sólidos produzidos foram avaliadas recorrendo a ensaios de tração.

- Filme de HPC com tetraciclina:

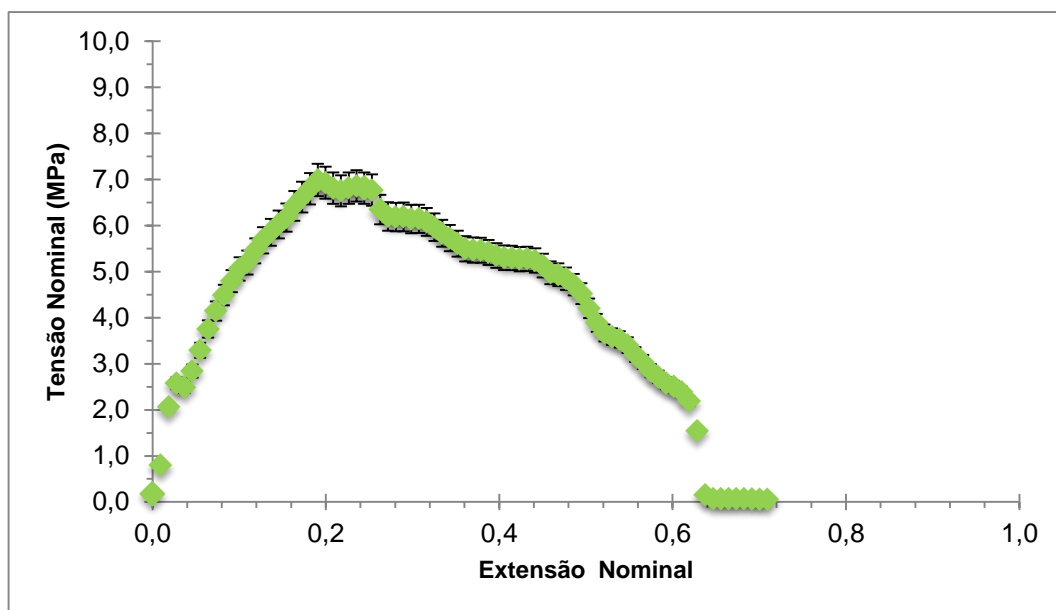


Figura 3.27-Curva típica tensão nominal – extensão nominal obtida no ensaio de tração do filme de HPC com incorporação da tetraciclina.

Tabela 3.14 - Valores médios dos parâmetros obtidos através do ensaio de tração dos filmes de HPC e de HPC com incorporação da tetraciclina.

	Resistência Máxima (MPa)	Extensão máxima de Fratura (%)	Módulo de Young (MPa)
Filme HPC (Almeida, 2003)	5.6 ± 0.6	$80,0 \pm 20,0$	109 ± 21
Filme HPC com tetraciclina	8.1 ± 0.8	$61,0 \pm 18,0$	60.7 ± 5.1

Pela análise da Figura 3.27 foi possível constatar que o polímero HPC com tetraciclina demonstra um comportamento no regime elástico assim como apresenta depois deformação plástica, possuindo um módulo de *Young* de 60.7 MPa. Como base em estudos anteriores, referenciados na Tabela 3.14, é possível comparar os parâmetros obtidos nestes ensaios de tração, com os de filmes que contém apenas polímero HPC.

O filme de HPC com tetraciclina apresenta uma resistência máxima de 8.1 MPa, um pouco maior que o filme de HPC de 5.6 MPa. Estes resultados sugerem que o filme de HPC com tetraciclina se tornou ligeiramente mais rígido e menos deformável, suportando uma maior tensão antes de fraturar, mas deformando-se menos antes da fractura.

Estes resultados demonstram que os filmes de HPC com tetraciclina possuem a robustez mecânica necessária para serem aplicados em pensos, mantendo a sua forma e integridade física até serem removidos por dissolução com água.

Não foram efetuados ensaios de tração com os produtos naturais marinhos PTM-410;F2+F3;F35 e PTM-29;F4;F39 por limitação da quantidade de composto disponível.

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

Em suma, com este trabalho foi possível concluir que dos 49 compostos puros provenientes das estirpes PTM-346 e PTM-420 da espécie *Streptomyces aculeolatus* testados, onze demonstraram atividade anti-biofilme contra diferentes estirpes de *S. aureus* (NCTC 8325, WIS, MW2, HDE288). Estes compostos anti-biofilme poderão ser uma aposta para o desenvolvimento de novos produtos com um importante valor biotecnológico e aplicações industriais.

Relativamente ao desenvolvimento de dois compósitos poliméricos com atividade antimicrobiana para o tratamento de feridas ou queimadura infectadas com *S. aureus*, optou-se pela utilização do polímero HPC porque apresentou características mais adequadas para ser utilizado em pensos, pois ao ser solúvel água, não necessitava de ser removido evitando causar dor e trauma aos pacientes. Para tal, foram elaborados filmes finos sólidos de HPC com incorporação de compostos puros provenientes de actinobactérias PTM-420;F2+F3;F35 e PTM-29;F4;F39 que demonstraram propriedades antimicrobianas. Depois de realizados ensaios de determinação de halos de inibição com os estes discos observou-se que os compostos se difundiram a uma velocidade inferior aos discos de HPC com tetraciclina (utilizados como modelo de comparação).

Futuramente, de modo a compreender o processo de difusão dos compostos poderiam ser realizados testes de difusividade. Para a optimização da produção dos compósitos poliméricos sugere-se a utilização de outros polímeros solúveis em água ou de outros compostos antimicrobianos produzidos por actinobactérias marinhas com características mais planares, menos apolares e com menor afinidade para o polímero.

5. Referências Bibliográficas

- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., and Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol* 196, 453-72.
- Abdelrahman, T., and Newton, H. (2011). Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)* 29, 491-495.
- Abraham, N. M., and Jefferson, K. K. (2010). A low molecular weight component of serum inhibits biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* 49, 388-91.
- Almeida, P. (2003). Estudo e optimização de um novo dispositivo electro-óptico tipo PDLC, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- Ammons, M. C. (2010). Anti-biofilm strategies and the need for innovations in wound care. *Recent patents on anti-infective drug discovery* 5, 10-17.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., and Costerton, J. W. (2012). Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 33, 5967-82.
- Arumugam, M., Mitra, A., Jaisankar, P., Dasgupta, S., Sen, T., Gachhui, R., Kumar Mukhopadhyay, U., and Mukherjee, J. (2010). Isolation of an unusual metabolite 2-allyloxyphenol from a marine actinobacterium, its biological activities and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 109-17.
- Aytac, Z., Sen, H. S., Durgun, E., and Uyar, T. (2015). Sulfisoxazole/cyclodextrin inclusion complex incorporated in electrospun hydroxypropyl cellulose nanofibers as drug delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces* 128, 331-8.
- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K.-i., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., and Hiramatsu, K. (2002). Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *The Lancet* 359, 1819-1827.
- Bakkiyaraj, D., and Pandian, S. K. (2010). In vitro and in vivo antibiofilm activity of a coral associated actinomycete against drug resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biofouling* 26, 711-7.
- Berger-Bachi, B., and Rohrer, S. (2002). Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol* 178, 165-71.
- Bhardwaj, N., and Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv* 28, 325-47.
- Bos, R., Van der Mei, H. C., and Busscher, H. J. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study. *FEMS microbiology reviews* 23, 179-230.
- Boucher, H. W., and Sakoulas, G. (2007). Perspectives on Daptomycin resistance, with emphasis on resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 45, 601-8.

- Bull, A. T., and Stach, J. E. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol* 15, 491-9.
- Callister Jr., W. D. (2008). *Ciência e Engenharia dos Materiais, uma Introdução*. (Anthares, ed.), Rio de Janeiro.
- Canejo, J. P., Borges, J. P., Godinho, M. H., Brogueira, P., Teixeira, P. I. C., and Terentjev, E. M. (2008). Helical Twisting of Electrospun Liquid Crystalline Cellulose Micro- and Nanofibers. *Advanced Materials* 20, 4821-4825.
- Carneiro, V. A., Santos, H. S., Arruda, F. V., Bandeira, P. N., Albuquerque, M. R., Pereira, M. O., Henriques, M., Cavada, B. S., and Teixeira, E. H. (2011). Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. *Molecules* 16, 190-201.
- Charan, R. D., Schlingmann, G., Janso, J., Bernan, V., Feng, X., and Carter, G. T. (2004). Diazepinomicin, a New Antimicrobial Alkaloid from a Marine Micromonospora sp. *Journal of Natural Products* 67, 1431-1433.
- Chen, X., Shang, F., Meng, Y., Li, L., Cui, Y., Zhang, M., Qi, K., and Xue, T. (2015). Ethanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. inhibits biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an ica-dependent manner. *J Dairy Sci* 98, 8486-91.
- Couto, I., Wu, S. W., Tomasz, A., and de Lencastre, H. (2003). Development of Methicillin Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus sciuri* by Transcriptional Activation of the *mecA* Homologue Native to the Species. *J Bacteriol* 185, 645-653.
- Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W., and Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and immunity* 67, 5427-5433.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., and Penades, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183, 2888-96.
- Czaczyk, K., and Myszka, K. (2007). Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies* 16, 799.
- Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A. W., Bruggeman, C. A., and Stobberingh, E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 13, 222-35.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., and Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13, 16-34.
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167-193.
- Dunne, W. M. (2002). Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clin Microbiol Rev* 15, 155-166.

- Ermolaeva, S. A., Sysolyatina, E. V., and Gintsburg, A. L. (2015). Atmospheric pressure nonthermal plasmas for bacterial biofilm prevention and eradication. *Biointerphases* 10, 029404.
- Ferrarezi, M. M. F., Rodrigues, G. V., Felisberti, M. I., and Gonçalves, M. d. C. (2013). Investigation of cellulose acetate viscoelastic properties in different solvents and microstructure. *European Polymer Journal* 49, 2730-2737.
- Figueiredo, T. A., Ludovice, A. M., and Sobral, R. G. (2014). Contribution of peptidoglycan amidation to beta-lactam and lysozyme resistance in different genetic lineages of *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist* 20, 238-49.
- Fisher, J. F., Meroueh, S. O., and Mobashery, S. (2005). Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity. *Chemical Reviews* 105, 395-424.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology* 10, 226-236.
- Flemming, H. C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623-33.
- Fluit, A. C., Visser, M. R., and Schmitz, F. J. (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 14, 836-71, table of contents.
- Foster, T. J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology* 3, 948-958.
- Fukuda, D. S., Mynderse, J.S., Baker, P.J., Berry, D.M., Boeck, L.D., Yao, R.C., Mertz, F.P., Nakatsukasa, W.M., Mabe, J., Ott, J. (1989). A80915, a new antibiotic complex produced by *Streptomyces aculeolatus*. Discovery, taxonomy, fermentation, isolation, characterization, and antibacterial evaluation. *The journal of antibiotic* 153, 623-633.
- Geoghegan, J. A., Corrigan, R. M., Gruszka, D. T., Speziale, P., O'Gara, J. P., Potts, J. R., and Foster, T. J. (2010). Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 192, 5663-73.
- Gill, S. R., Fouts, D. E., Archer, G. L., Mongodin, E. F., Deboy, R. T., Ravel, J., Paulsen, I. T., Kolonay, J. F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R. J., Daugherty, S. C., Madupu, R., Angiuoli, S. V., Durkin, A. S., Haft, D. H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I. R., Nelson, K. E., and Fraser, C. M. (2005). Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* 187, 2426-38.
- Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J.-C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piémont, Y., Brousse, N., Floret, D., and Etienne, J. (2002). Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *The Lancet* 359, 753-759.

- Govindarajan, G., Satheeja Santhi, V., and Jebakumar, S. R. (2014). Antimicrobial potential of phylogenetically unique actinomycete, *Streptomyces* sp. JRG-04 from marine origin. *Biologicals* 42, 305-11.
- Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P. E., Lew, D. P., and Poster, T. J. (1995). Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Molecular Microbiology* 17, 1143-1152.
- Gu, B., Kelesidis, T., Tsiodras, S., Hindler, J., and Humphries, R. M. (2013). The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J Antimicrob Chemother* 68, 4-11.
- Haaber, J., Cohn, M. T., Petersen, A., and Ingmer, H. (2016). Simple method for correct enumeration of *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods* 125, 58-63.
- Harris, L. G., Foster, S. J., and Richards, R. G. (2002). AN INTRODUCTION TO STAPHYLOCOCCUS AUREUS, AND TECHNIQUES FOR IDENTIFYING AND QUANTIFYING S. AUREUS ADHESINS IN RELATION TO ADHESION TO BIOMATERIALS: REVIEW. 4, 39-60.
- Hibbeler, R. C. (2004). Resistência dos Materiais. (Pearson, ed.), São Paulo.
- Hobby, G. H., Quave, C. L., Nelson, K., Compadre, C. M., Beenken, K. E., and Smeltzer, M. S. (2012). *Quercus cerris* extracts limit *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *J Ethnopharmacol* 144, 812-5.
- Ito, T., Ma, X. X., Takeuchi, F., Okuma, K., Yuzawa, H., and Hiramatsu, K. (2004). Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2637-51.
- Joshi, S. G., Paff, M., Friedman, G., Fridman, G., Fridman, A., and Brooks, A. D. (2010). Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: a biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *Am J Infect Control* 38, 293-301.
- Karatan, E., and Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 310-47.
- Kokai-Kun, J. F., Chanturiya, T., and Mond, J. J. (2009). Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. *J Antimicrob Chemother* 64, 94-100.
- Konwarh, R., Karak, N., and Misra, M. (2013). Electrospun cellulose acetate nanofibers: the present status and gamut of biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 31, 421-37.
- Kurokawa, K., Takahashi, K., and Lee, B. L. (2016). The staphylococcal surface-glycopolymer wall teichoic acid (WTA) is crucial for complement activation and immunological defense against *Staphylococcus aureus* infection. *Immunobiology* 221, 1091-1101.
- Kwasny, S. M., and Opperman, T. J. (2010). Static biofilm cultures of Gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol* Chapter 13, Unit 13A 8.

- Lam, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol* 9, 245-51.
- Larsson, M., Hjartstam, J., Berndtsson, J., Stading, M., and Larsson, A. (2010). Effect of ethanol on the water permeability of controlled release films composed of ethyl cellulose and hydroxypropyl cellulose. *Eur J Pharm Biopharm* 76, 428-32.
- Lazazzera, B. A. (2005). Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. *Curr Opin Microbiol* 8, 222-7.
- Lee, J. H., Kim, Y. G., Lee, K., Kim, C. J., Park, D. J., Ju, Y., Lee, J. C., Wood, T. K., and Lee, J. (2016). Streptomyces-derived actinomycin D inhibits biofilm formation by Staphylococcus aureus and its hemolytic activity. *Biofouling* 32, 45-56.
- Manivasagan, P., Kang, K. H., Sivakumar, K., Li-Chan, E. C., Oh, H. M., and Kim, S. K. (2014a). Marine actinobacteria: an important source of bioactive natural products. *Environ Toxicol Pharmacol* 38, 172-88.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., and Kim, S. K. (2013). Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiol Res* 168, 311-32.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., and Kim, S. K. (2014b). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiol Res* 169, 262-78.
- Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L. H., Smeltzer, M. S., Horswill, A. R., and Bayles, K. W. (2009). Modulation of eDNA release and degradation affects Staphylococcus aureus biofilm maturation. *PloS one* 4, e5822.
- Mato R., de Lencastre H., Roberts R B., and Tomasz A. (1996). Multiplicity of Genetic Backgrounds among Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium Isolates Recovered from an Outbreak in a New York City Hospital. *Microbial Drug Resistance* 2.
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., and Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* 10, 39-50.
- Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E., Lopez, J. A., Foster, T. J., Penades, J. R., and Lasa, I. (2009). Protein A-mediated multicellular behavior in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* 191, 832-43.
- Milheirico, C., Oliveira, D. C., and de Lencastre, H. (2007). Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3374-7.
- Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., and Fenical, W. (2002). Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5005-5011.
- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B., and Forestier, C. (2016). Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front Microbiol* 7, 592.
- Mohanty, S., Mishra, S., Jena, P., Jacob, B., Sarkar, B., and Sonawane, A. (2012). An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomedicine* 8, 916-24.

- Novick, R. (1967). Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* 33, 155-166.
- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D. A., Loughman, A., Foster, T. J., and O'Gara, J. P. (2008). A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol* 190, 3835-50.
- O'brien, F., Pearman, J., Gracey, M., Riley, T., and Grubb, W. (1999). Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. *Journal of clinical microbiology* 37, 2858-2862.
- Ogawa, A., Nakayama, S., Uehara, M., Mori, Y., Takahashi, M., Aiba, T., and Kurosaki, Y. (2014). Pharmaceutical properties of a low-substituted hydroxypropyl cellulose (L-HPC) hydrogel as a novel external dressing. *Int J Pharm* 477, 546-52.
- Oliveira, D. C., Tomasz, A., and de Lencastre, H. (2001). The Evolution of Pandemic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Identification of Two Ancestral Genetic Backgrounds and the Associated mec Elements. *Microbial Drug Resistance* 7.
- Quelemes, P. V., Perfeito, M. L., Guimaraes, M. A., dos Santos, R. C., Lima, D. F., Nascimento, C., Silva, M. P., Soares, M. J., Ropke, C. D., Eaton, P., de Moraes, J., and Leite, J. R. (2015). Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms. *J Ethnopharmacol* 175, 287-94.
- Renner, L. D., and Weibel, D. B. (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull* 36, 347-355.
- Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S., and Bayles, K. W. (2007). The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8113-8.
- Roemer, T., Schneider, T., and Pinho, M. G. (2013). Auxiliary factors: a chink in the armor of MRSA resistance to beta-lactam antibiotics. *Curr Opin Microbiol* 16, 538-48.
- Rohde, H., Burandt, E. C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., Scherpe, S., Davies, A. P., Harris, L. G., Horstkotte, M. A., Knobloch, J. K., Ragunath, C., Kaplan, J. B., and Mack, D. (2007). Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 28, 1711-20.
- Rosenthal, V. D., Bijie, H., Maki, D. G., Mehta, Y., Apisarnthanarak, A., Medeiros, E. A., Leblebicioglu, H., Fisher, D., Alvarez-Moreno, C., Khader, I. A., Del Rocio Gonzalez Martinez, M., Cuellar, L. E., Navoa-Ng, J. A., Abouqal, R., Guanche Garcell, H., Mitrev, Z., Pirez Garcia, M. C., Hamdi, A., Duenas, L., Cancel, E., Gurskis, V., Rasslan, O., Ahmed, A., Kanj, S. S., Ugalde, O. C., Mapp, T., Raka, L., Yuet Meng, C., Thu le, T. A., Ghazal, S., Gikas, A., Narvaez, L. P., Mejia, N., Hadjieva, N., Gamar Elanbya, M. O., Guzman Sirit, M. E., and Jayatilleke, K. (2012). International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. *Am J Infect Control* 40, 396-407.

- Ruggiero, R., de Almeida Carvalho, V., da Silva, L. G., de Magalhães, D., Ferreira, J. A., de Menezes, H. H. M., de Melo, P. G., and Naves, M. M. (2015). Study of in vitro degradation of cellulose acetate membranes modified and incorporated with tetracycline for use as an adjuvant in periodontal reconstitution. *Industrial Crops and Products* 72, 2-6.
- Sá-Leão, R., Santos Sanches, I., Dias, D., Peres, I., Barros, R. M., & de Lencastre, H. (1999). Detection of an Archaic Clone of *Staphylococcus aureus* with Low-Level Resistance to Methicillin in a Pediatric Hospital in Portugal and in International Samples: Relics of a Formerly Widely Disseminated Strain? *Journal of Clinical Microbiology* 37(6), 1913–1920.
- Schumacher, R. W., Talmage, S. C., Miller, S. A., Sarris, K. E., Davidson, B. S., and Goldberg, A. (2003). Isolation and Structure Determination of an Antimicrobial Ester from a Marine Sediment-Derived Bacterium. *Journal of Natural Products* 66, 1291-1293.
- Shin, K., Yun, Y., Yi, S., Lee, H. G., Cho, J. C., Suh, K. D., Lee, J., and Park, J. (2013). Biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from human skin. *J Dermatol Sci* 71, 130-7.
- Shukla, S., Brinley, E., Cho, H. J., and Seal, S. (2005). Electrospinning of hydroxypropyl cellulose fibers and their application in synthesis of nano and submicron tin oxide fibers. *Polymer* 46, 12130-12145.
- Smith, T. L., Pearson, M. L., Wilcox, K. R., Cruz, C., Lancaster, M. V., Robinson-Dunn, B., Tenover, F. C., Zervos, M. J., Band, J. D., and White, E. (1999). Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *New England Journal of Medicine* 340, 493-501.
- Solanki, R., Khanna, M., and Lal, R. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian journal of microbiology* 48, 410-431.
- Somerville, G. A., and Proctor, R. A. (2009). The Biology of *Staphylococci*. In "Staphylococci in Human Disease", pp. 1-18. Wiley-Blackwell.
- Subramani, R., and Aalbersberg, W. (2012). Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol Res* 167, 571-80.
- Suzuki, N., Ohtaguro, N., Yoshida, Y., Hirai, M., Matsuo, H., Yamada, Y., Imamura, N., and Tsuchiya, T. (2015). A compound inhibits biofilm formation of *Staphylococcus aureus* from *Streptomyces*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 38, 889-892.
- Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M., and Nakonieczna, J. (2013). Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *Biomed Res Int* 2013, 150653.
- Tetz, G. V., Artemenko, N. K., and Tetz, V. V. (2009). Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1204-9.
- Tristan, A., Ying, L., Bes, M., Etienne, J., Vandenesch, F., and Lina, G. (2003). Use of Multiplex PCR To Identify *Staphylococcus aureus* Adhesins Involved in Human Hematogenous Infections. *Journal of clinical microbiology* 41, 4465-4467.

- Tutar, U., Çelik, C., Ataş, M., Tunç, T., and Gözel, M. G. (2015). Evaluation of biofilm formation activity of standard microorganism strains. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 6.
- Vowden, K., and Vowden, P. (2014). Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)* 32, 462-467.
- Wang, B., and Muir, T. W. (2016). Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell Chem Biol* 23, 214-24.
- Weisblum, B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 577.
- Wingender, J., and Flemming, H. C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int J Hyg Environ Health* 214, 417-23.
- Wu, S. W., de Lencastre, H., and Tomasz, A. (2001). Recruitment of the *mecA* Gene Homologue of *Staphylococcus sciuri* into a Resistance Determinant and Expression of the Resistant Phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183, 2417-2424.
- Wu, Z., Li, S., Li, J., Chen, Y., Saurav, K., Zhang, Q., Zhang, H., Zhang, W., Zhang, S., and Zhang, C. (2013). Antibacterial and cytotoxic new napyradiomycins from the marine-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 10428. *Mar Drugs* 11, 2113-25.
- Younis, K. M., Usup, G., and Ahmad, A. (2016). Secondary metabolites produced by marine streptomyces as antibiofilm and quorum-sensing inhibitor of uropathogen *Proteus mirabilis*. *Environ Sci Pollut Res Int* 23, 4756-67.

6. Anexos

Anexos I – Compostos promissores pertencentes à estirpe PTM-346

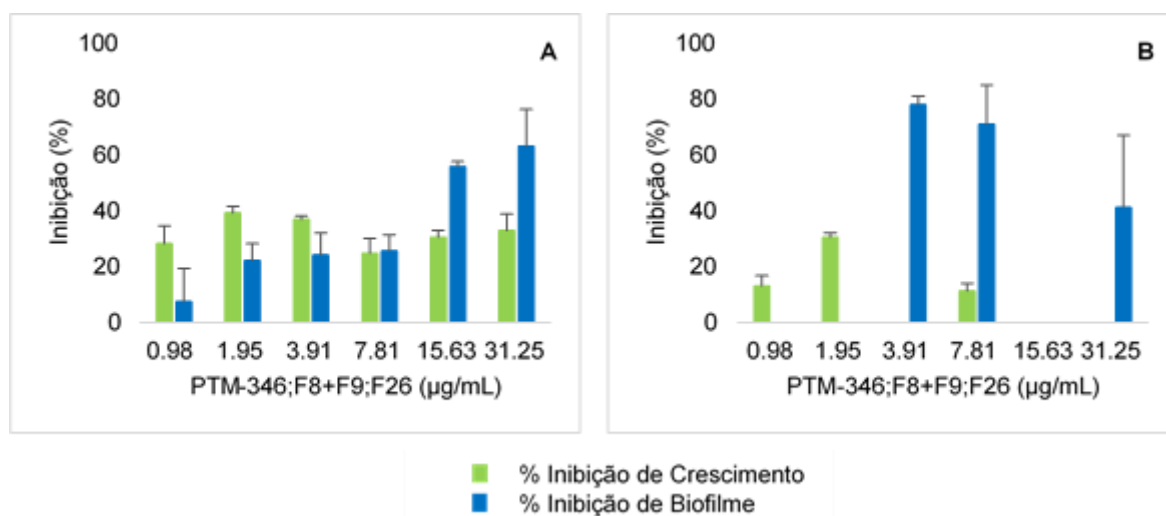


Figura 6.1 - Gráficos relativos ao composto PTM-346;F8+F9;F26 que relacionam as concentrações de testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme das estirpes *S. aureus* NCTC 8325 (A) e WIS (B).

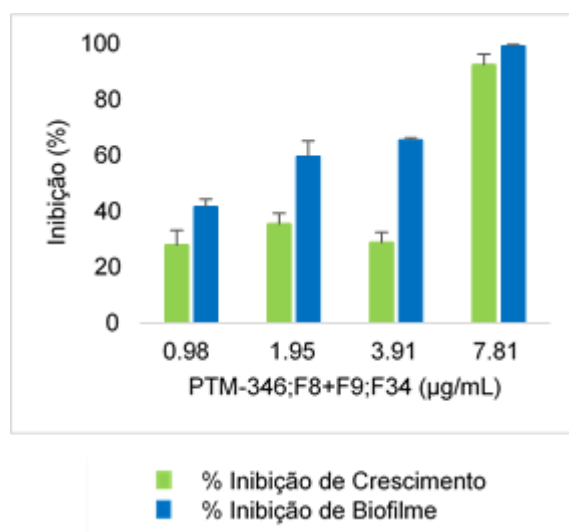


Figura 6.2 - Gráfico do composto PTM-346;F8+F9;F34 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de *S. aureus* NCTC 8325.

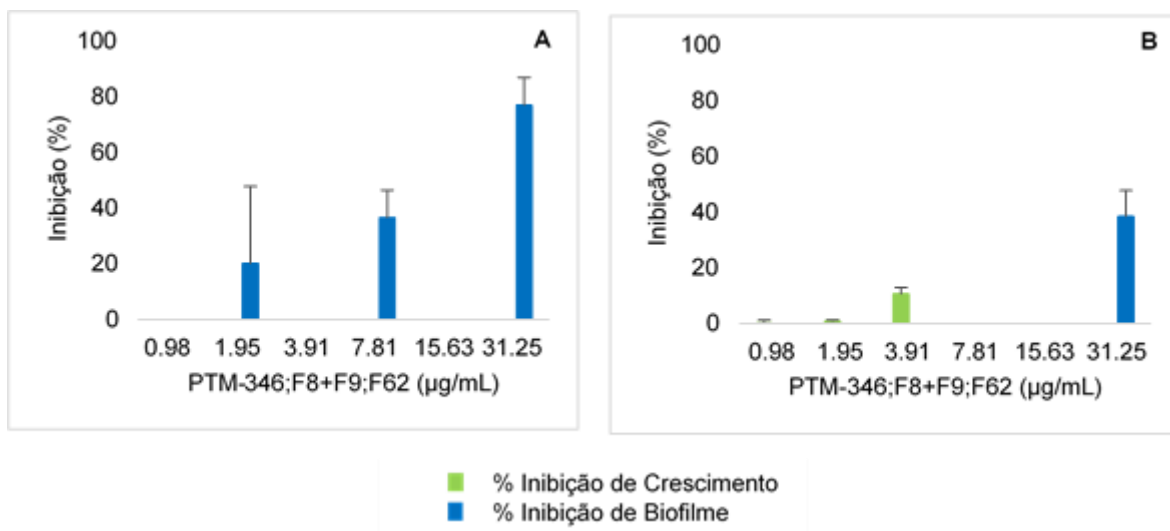


Figura 6.3 - Gráfico do composto PTM-346;F8+F9;62 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de *S. aureus* WIS (A) e HDE288 (B).

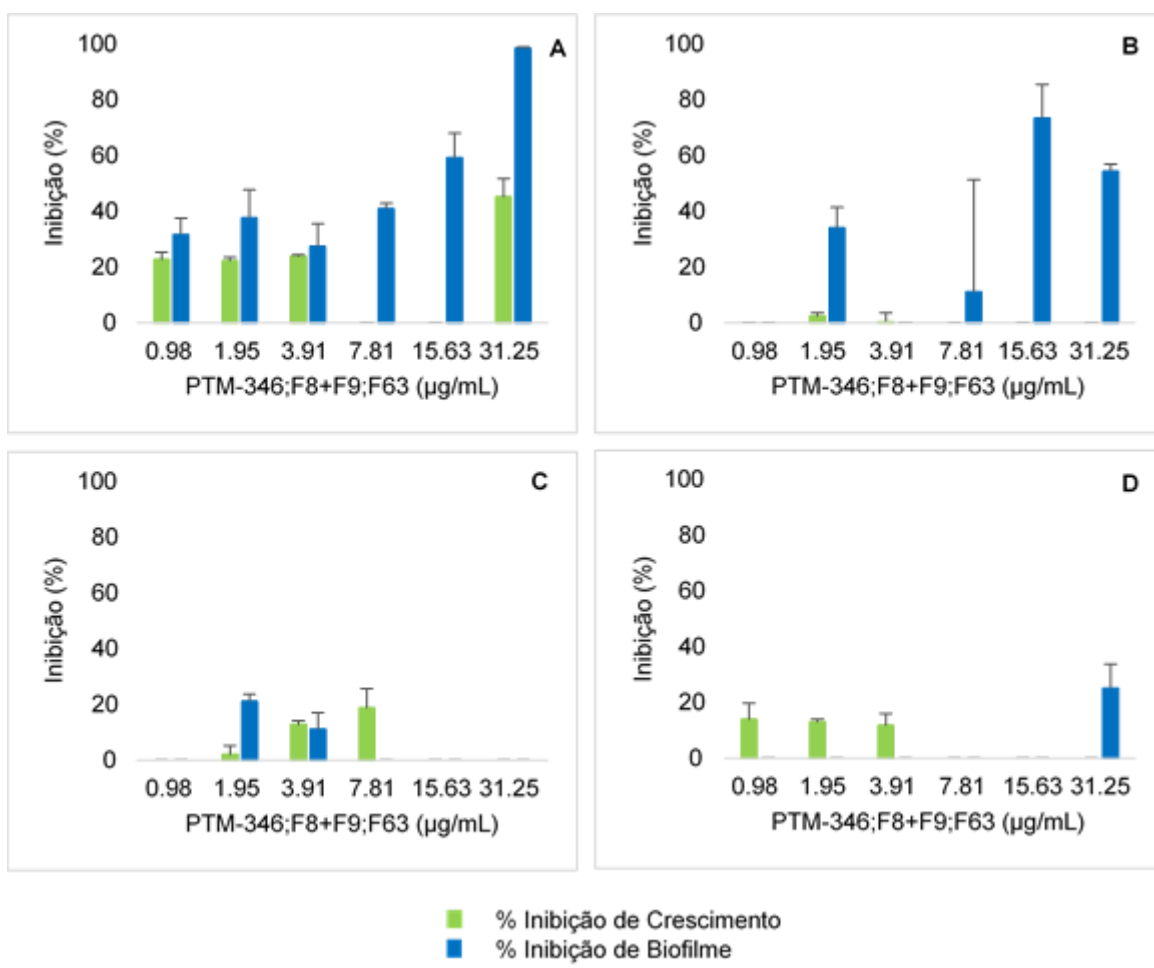


Figura 6.4 - Gráfico do composto PTM-346;F8+F9;63 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de *S. aureus* NCTC 8325 (A), WIS (B), MW2 (C) e HDE288 (D).

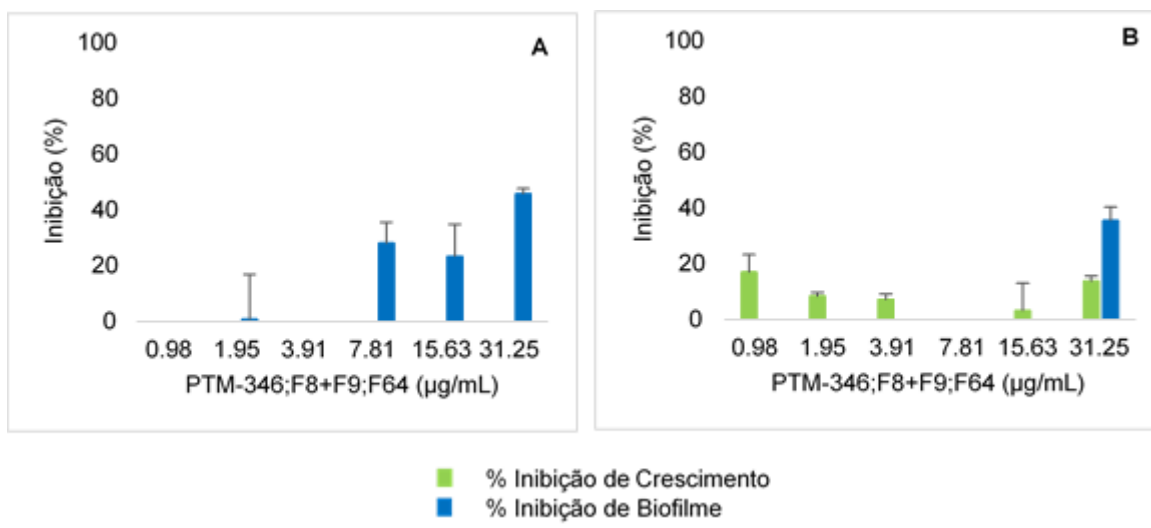


Figura 6.5 - Gráfico do composto PTM-346;F8+F9;64 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de *S. aureus* WIS (A) e HDE288 (B).

Anexos II – Compostos promissores pertencentes à estirpe PTM-420

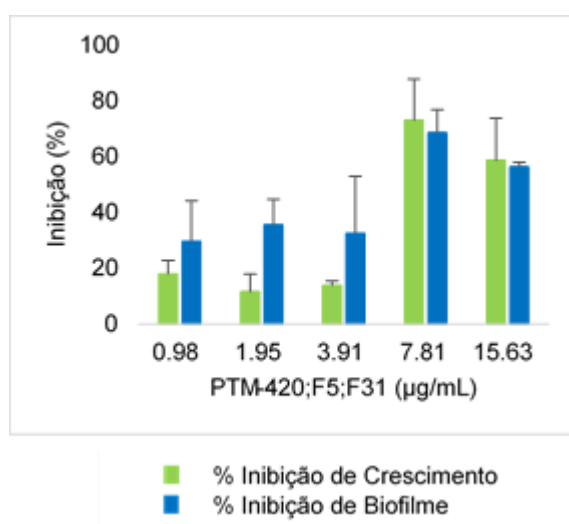


Figura 6.6 - Gráfico do composto PTM-420;F5;31 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de *S. aureus* WIS.

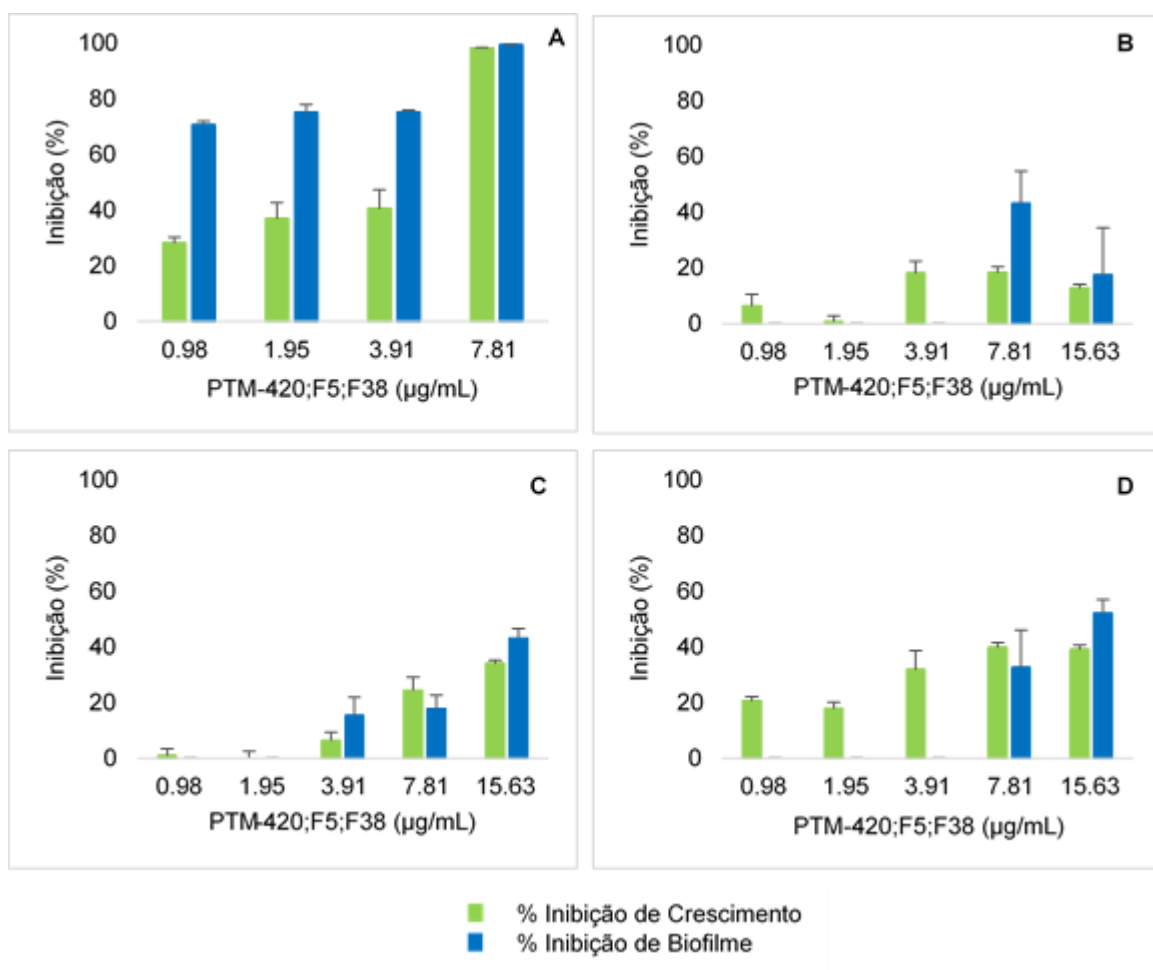


Figura 6.7 - Gráfico do composto PTM-420;F5;F38 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de *S. aureus* NCTC 8325 (A), WIS (B), MW2 (C) e HDE288 (D).

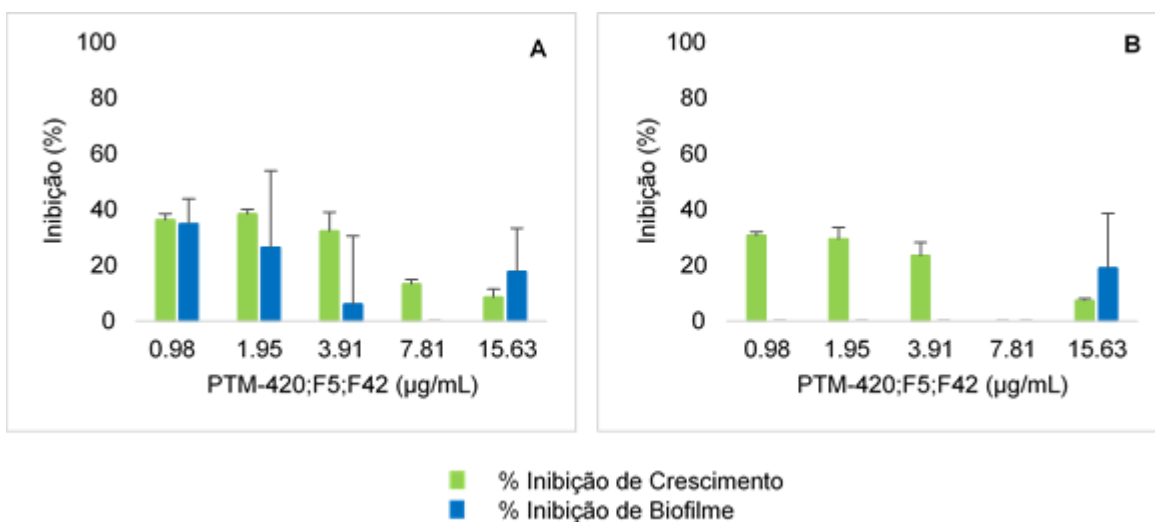


Figura 6.8 - Gráfico do composto PTM-420;F5;F42 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de *S. aureus* MW2 (A) e HDE288 (B).

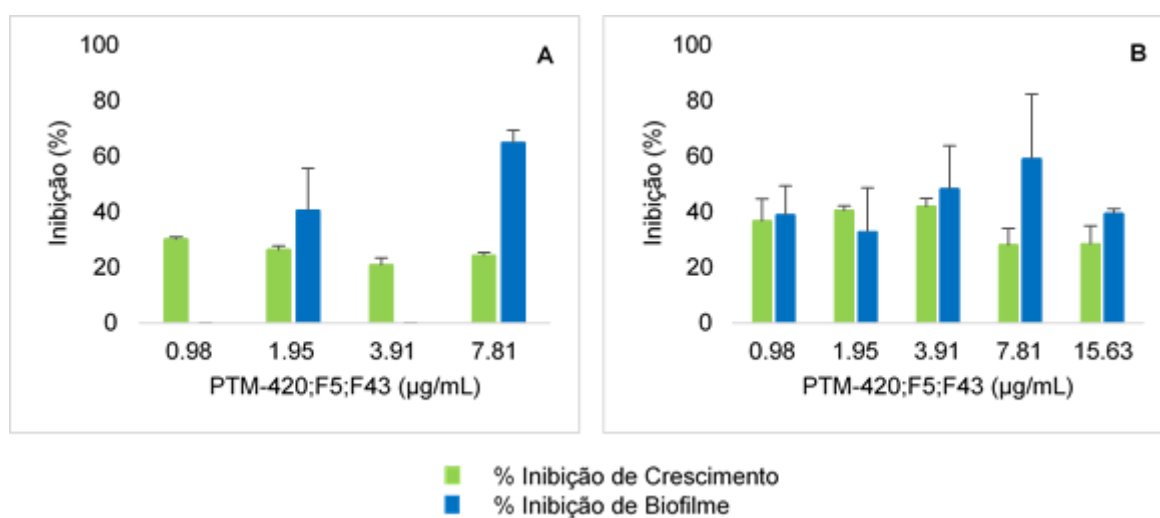


Figura 6.9 - Gráfico do composto PTM-420;F5;F43 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de *S. aureus* NCTC 8325 (A) e WIS (B).

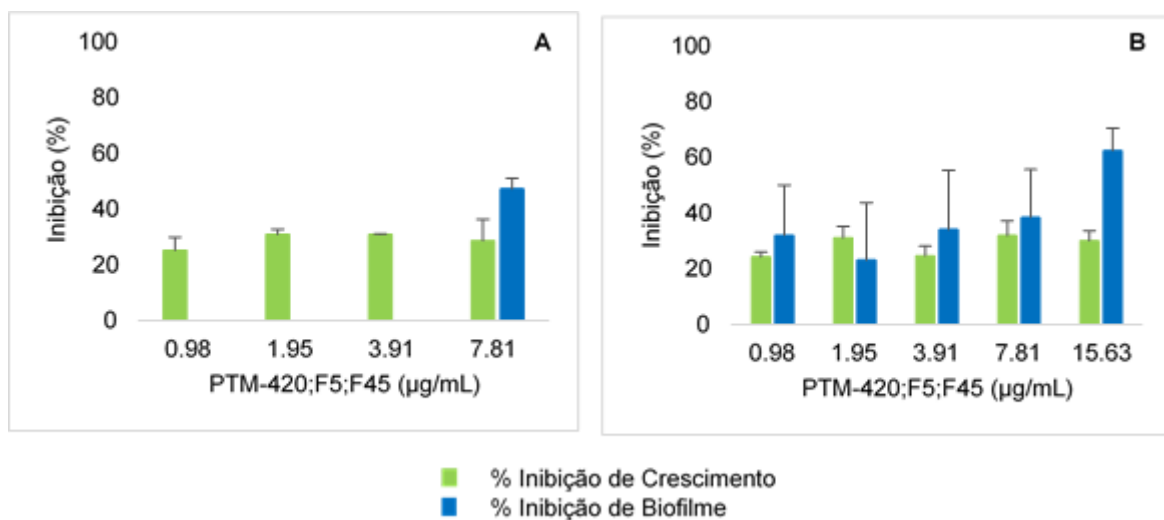


Figura 6.10 - Gráfico do composto PTM-420;F5;F45 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de *S. aureus* NCTC 8325 (A) e WIS (B).

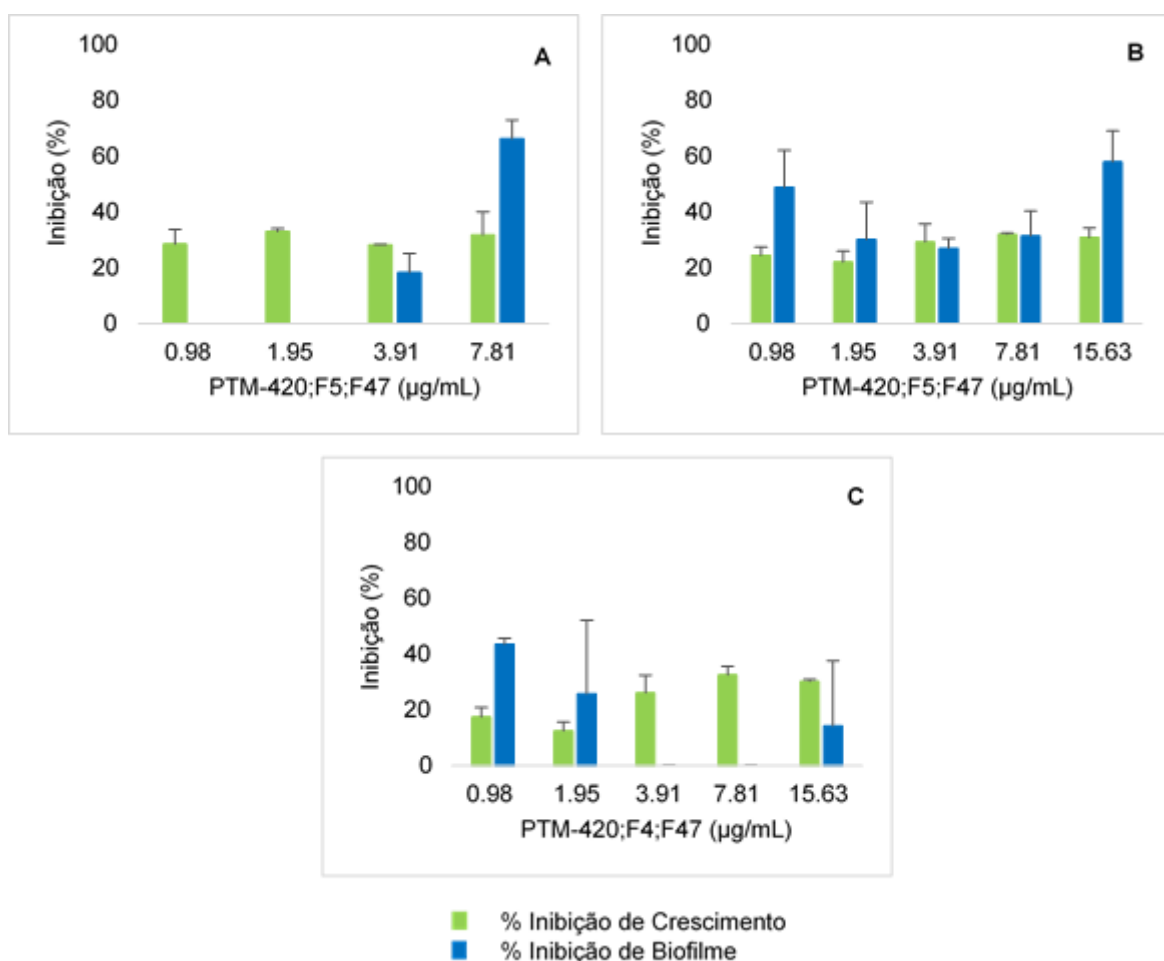


Figura 6.11 - Gráfico do composto PTM-420;F5;F47 que relaciona as concentrações testadas com as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da estirpe de *S. aureus* NCTC 8325 (A), WIS (B) e MW2 (C).

Anexos III – Cromatograma relativo à fração F2 da estirpe PTM-29

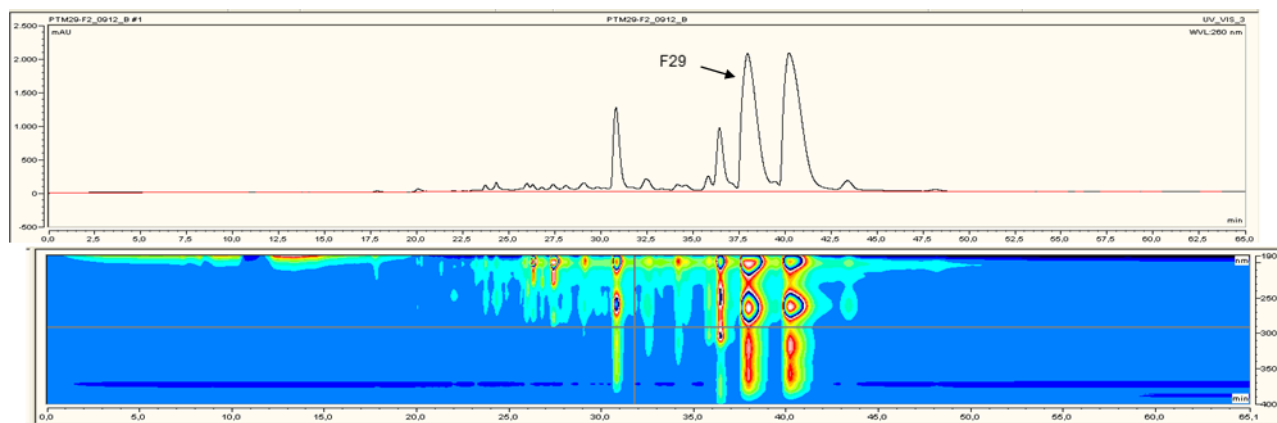


Figura 6. 12 – Cromatograma relativo à fração F2 da estirpe PTM-29.